Die radioimmunologische Bestimmung von Sekretin – Methodik, basale und stimulierte Hormonkonzentration im Plasma bei Ratte, Hund, Kaninchen und Mensch

Jürgen Wittmann

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544308_0028

Aus der Chirurgischen Klinik mit Poliklinik der Universität
Erlangen - Nürnberg
Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Hormonforschungslabor,
Prof. Dr. Dr. Schwille

vorgelegt über das

Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität
München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker
Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. U. Lösch

DIE RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON SEKRETIN - METHODIK, BASALE UND STIMULIERTE HORMONKONZENTRATION IM PLASMA BEI RATTE, HUND, KANINCHEN UND MENSCH

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Jürgen Karl Wittmann
aus
Schillingsfürst

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. G. Terplan
Referent:	Prof. Dr. U. Lösch
Korreferent:	Prof. Dr. W. Leidl

Tag der Promotion: 25. Februar 1983

UNIV. LEIDEN BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		SEITE
1.	EINFÜHRUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1	Materialien	3
2.1.1	Chemikalien	3
2.1.2	Gerätschaften	5
2.1.3	Reagentien	7
2.1.4	Definition sich wiederholender Bezeichnungen	8
2.2	Methoden beim Aufbau der radioimmunologischen Bestimmung (RIA) von Sekretin	8
2.2.1	Produktion von Antiseren gegen Sekretin	8
2.2.1.1	Koppelung von Sekretin mit Makromolekülen	8
2.2.1.2	Immunisierung von Kaninchen	9
2.2.1.3	Gewinnung von Seren	10
2.2.1.4	Bestimmung des Titers von Seren	10
2.2.1.5	Lagerung von Serum für den Radioimmunoassay	11
2.2.2	Markierung von Sekretin	11
2.2.3	Reinigung von markiertem Sekretin	13
2.2.3.1	Auf Sephadex(Gel-Chromatographie)	13
2.2.3.2	Auf SP Sephadex (Ionenaustausch-Chromatographie)	13
2.2.3.3	Einbaurate von radioaktivem Salz und spezifische Aktivität des im Radioimmunoassay verwendeten Tracers	13
2.2.3.4	Lagerung und Weiterverarbeitung des markierten Sekretins	13
2.2.4	Bewertung der Schädigung von markiertem Sekretin	14
2.2.4.1	Das sog. "jodination damage"	14

		SEITE
2.2.4.1.1	Durch Talk-Resin-Trichloressig-säure-Test	14
2.2.4.1.2	Durch Prüfung der Bindungsfähigkeit von Tracer an Exzeß-Antikörper-Konzentration.	14
2.2.4.2	Das "incubation damage" und seine Bewertung mittels Elektrophorese	15
2.2.4.2.1	Tracer-Inkubation in verschiedenen Verdünnungsmitteln	15
2.2.4.2.2	Verdauungstest mit Trypsin	15
2.2.5	Herstellung von hormonfreiem Plasma	16
2.2.6	Bedingungen für den Radioimmunoassay von Sekretin	16
2.2.6.1	Antikörper und Affinität zwischen Antikörper und Sekretin	16
2.2.6.2	Wahl der Tracerdosis für den Assay	16
2.2.6.3	Einfluß unterschiedlicher Verdünnungsmittel auf die Standardkurve	17
2.2.6.4	Abhängigkeit der Tracerbindung an den Antikörper von der Inkubationszeit	17
2.2.6.5	Trennverfahren	17
2.2.6.6	Abhängigkeit der Tracerbindung von der Kohle-Dextran-Menge	18
2.2.6.7	Ansatz der Standardkurve	18
2.2.6.8	Optimierung der Inkubationszeiten, d.h. bei sofortiger Tracer-Zugabe bzw. bei dessen zeitlich versetzter Zugabe (sog. Dysäquilibrium-System)	19
2.2.6.9	Reproduzierbarkeit der Standardkurve	19
2.2.6.10	Sensitivität der Standardkurve	20
2.2.7	Quantifizierung von Sekretin pro Standarddosis Tracer mittels Hemmkurve	20
2.2.8	Kreuzreaktionen des Sekretin-Radioimmunoassay mit anderen Hormonen	20

		SEITE
2.3	Bestimmung von Sekretin im Plasma	21
2.3.1	Bestimmung der Adsorption von Tracer-Sekretin an Quso im Plasma	21
2.3.2	Plasma-Sekretin durch Differenzberechnung	21
2.3.2.1	Quso-Behandlung von Plasma	22
2.3.2.2	Aufbereitung von Plasma bzw. Quso-Plasma für den Probenansatz	22
2.3.2.3	Wiederfindung von synthetischem Standard-Sekretin	22
2.3.2.4	Adsorption von synthetischem Standard-Sekretin an Quso	23
2.3.2.5	Reproduzierbarkeit der Bestimmung von gepoolten humanem Plasma	23
2.3.3	Extraktionsverfahren	23
2.3.3.1	Effizienz der Extraktion von Tracer-Sekretin aus Plasma	23
2.3.3.2	Extraktion von Plasma	24
2.3.3.3	Einfluß der Extraktion auf die Sekretin-Immunoreaktivität und die Wiederfindung von synthetischem Standard-Sekretin	24
2.3.3.4	Bewertung der unspezifischen Sekretin-Immunoreaktivität im Plasma	24
2.3.4	Nüchternblut-Entnahme beim Versuchstier und Menschen - Basales Plasma-Sekretin	25
2.3.5	Intraduodenale Infusion von HCl oder NaCl zum Studium der Änderung von Plasma-Sekretin bei der Ratte	25
2.3.6	Verabreichung einer Testmahlzeit beim Hund zum Studium des Verhaltens von postprandialem Plasma-Sekretin	26
2.3.7	Einnahme einer synthetischen Probekost zum Studium von postprandialem Plasma-Sekretin beim Menschen	26
2.3.8	Verdünnbarkeit von postprandialem Humanplasma und Haltbarkeit nach Lagerung bei 4 ^{o} C.	26
2.3.9	Engere Charakterisierung der Immunoreaktivität im Plasma mittels Gel-Chromatographie	27
2.3.10	Präsentation der Daten und Statistik	28

		SEITE
3	ERGEBNISSE	28
3.1	Nötige Einzelschritte beim Aufbau der radioimmunologischen Bestimmung (RIA) von Sekretin	28
3.1.1	Produktion von Antiseren durch Kopplung von Sekretin an Proteine, sowie Bestimmung des Titers	28
3.1.2	Reinigung von markiertem Sekretin, Ausbeute, spezifische Aktivität und Lagerung des Tracers	33
3.1.3	Die Schädigung von markiertem Sekretin (= Qualitätsprüfung des Tracers)	39
3.1.4	Optimierung der Bedingungen für den Radioimmunoassay von Sekretin	43
3.1.5	Quantifizierung mittels Hemmkurve von Sekretin pro Tracer-Dosis	50
3.1.6	Kreuzreaktion des Sekretin Radioimmunoassay mit anderen Hormonen	54
3.2	Basales Sekretin im Plasma	54
3.2.1	Die Adsorption von Tracer im Plasma an zugegebenes Quso	54
3.2.2	Plasma-Sekretin durch Differenzberechnung	55
3.2.3	Die Extraktionsverfahren	57
3.2.4	Basales Plasma-Sekretin verschiedener Spezies	59
3.2.5	Wirkungen intraduodenaler HCl oder NaCl-Infusion auf Plasma-Sekretin bei der Ratte	60
3.2.6	Wirkung einer Probekost auf Plasma -Sekretin beim gesunden Hund und beim Hund okkludiertem Pankreasgang	60
3.2.7	Wirkung einer Testmahlzeit auf Plasma-Sekretin beim gesunden nüchternen Menschen	61
3.2.8	Verdünnbarkeit von postprandialem Humanplasma und Haltbarkeit nach Lagerung bei 4 ^{o} C.	64

		SEITE
3.2.9	Engere Charakterisierung der Immunoreaktivität im Plasma mittels Gelchromatographie	64
4	DISKUSSION	68
4.1	Kritik der Methoden	68
4.2.	Kritik der Ergebnisse zu radioimmunologisch meßbarem Sekretin	74
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
	SUMMARY	82
6	Anhang	84
7	LITERATUR	87

1. EINFÜHRUNG

Sekretin, ein basisches Polypeptid aus den Zellen der Dünndarm-Mucosa, Kettenlänge 27 Amminosäuren (H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH_2 (1) Molekulargewicht (MG) ca. 3500, ist seit Bayliss und Starling (2) als potenter Stimulus eines bikarbonat-reichen Pankreassaftes bekannt. Zusätzlich zu seinen Wirkungen auf das exokrine Pankreas hat es stimulierende Wirkung auf die Sekretion von Galle, Pepsin, eine hemmende Wirkung auf die Sekretion von Magensäure, Freisetzung von Gastrin, sowie gastrointestinale Motilität (3,4). Während diese Effekte sowohl pharmakologischen Dosen an exokrinem Sekretin, als auch endogenem Sekretin zu eigen scheinen (= biologische Wirkungen), ist von einigen in jüngster Zeit berichteten Prozessen unklar, ob auf sie endogenes Sekretin einen modifizierenden Einfluß hat. Hierunter fallen: Stimulation von calciotropen Hormonen wie Calcitonin und Parathormon (5), renale Exkretion von Natrium, Kalium, Mineralien, Wasser (6), kardiovaskuläre Änderungen, insbesondere des arteriellen splanchnischen Blutflußes (7) und der Mikrozirkulation (8) im Splanchnikusgebiet, metabolische Ereignisse wie Lipolyse und Freisetzung metabolischer Hormone (Insulin, Glukagon) (9).
Wichtige Voraussetzung für das Studium physiologischer Wirkungen von Sekretin ist die Verfügbarkeit über einen ausreichend empfindlichen Radioimmunoassay (RIA) für Sekretin. Mit der erfolgreichen Synthese von porcinem Sekretin (1), welches weitgehende strukturelle Identität mit menschlichen Sekretin haben soll (10), wurde die Entwicklung des Sekretin RIA entscheidend erleichtert. Hinzu kam, daß mittels DATA-Sekretin[1] (11), einem strukturellen Analog von porcinem Sekretin, die Präparation von Tracer-Sekretin mit ausreichend hoher spezifischer Aktivität möglich wird. In den zurückliegenden Jahren wurden mehrere Grundtypen des Sekretin-RIA bekannt, denen zum Teil eine hohe Empfindlichkeit gemeinsam sein soll (Nachweisgrenze $<$ 7pg/ml, entspricht $<$ 2 pM/L). Umgekehrt haften ihnen Nachteile an. Zu diesen zählen die Notwendigkeit der vorherigen Extraktion von Sekretin aus Plasma, was im Einzelfall zu unkontrollierten Extraktionsverlusten führen kann (12,13,14,15),

[1] Desamino-tyrosil-ß-alanyl-Secretin

kostspielige Trennung der freien von der antikörpergebundenen Phase des Sekretins mittels des sog. Doppel-Antikörper-Verfahrens (16,17), Unsicherheit darüber, welche molekulare Spezies von Sekretin mit einem gegebenen RIA nach vorausgegangener Extraktion gemessen wird.
Die meisten bisherigen Sekretin-RIAs erkennen zwar einen Anstieg von Plasma-Sekretin nach duodendaler Verabreichung von 0.05 - 0.02 M HCl, nicht jedoch einen postprandialen Sekretin-Anstieg (12,12,17,18,19,20,21).

In der vorliegenden Studie wird ein Sekretin-RIA vorgestellt, an dessen Aufbau drei Grundforderungen gestellt wurden: 1. eine hohe Empfindlichkeit, bei fehlender Notwendigkeit der vorherigen Extraktion von Plasma; 2. ein regelmäßig zu dokumentierender Sekretin-Anstieg im Plasma nach vorheriger Verabreichung einer Probemahlzeit; 3. das Meßsystem muß eine engere Charakterisierung von Sekretin-Immunoreaktivität im Plasma gestatten, d. h. eine Dokumentation hinsichtlich seiner Affinität zu höhermolekularen zirkulierenden Sekretin-Spezies. Die Arbeit gliedert sich in einen analytischen und einen physiologisch orientierten (Versuchstier, Mensch) Anteil. Wir können zeigen, daß unser Sekretin-RIA die obigen Forderungen erfüllt und sich für die Untersuchung von größeren Serien unbekannter Proben eignet.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Die folgenden Substanzen und Gerätschaften wurden benutzt:

2.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um pro analysi Reinheitsgrad

- DATA-Sekretin (Desaminotyrosil-ß-alanyl-Secretin)
- Synthetisches Sekretin
  alle von Fa. Bachem; Bubendorf (Schweiz)
- Natürliches Sekretin (Extraktives Material)
  Professor V. Mutt. GIH Karolinska Institutet; Stockholm
- Synthetisches porcines Sekretin, Prefessor E. Wünsch
  Max-Planck-Institut für Biochemie; Martinsried bei München
- Äthanol
- Aceton
- 5,5-Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz
- Barbitursäure
- Calciumchlorid-2-hydrat krist.
- Methanol
- Monokaliumphosphat
- Natriumacetat krist. reinst
- Natriumchlorid krist.
- Natrium-Meta-Bisulfit
- Natriumdisulfit trocken
- Trichloressigsäure
- Titriplex III (EDTA)
- Titrisol-Salzsäure
  alle von Merck; Darmstadt

- Antagosan-Ampullen, 200 000 KIE in je 10 ml
- Human-Albumin
- Natriumjodid (J^{125})
- Se.retin ^{R} (Gemisch aus Humanseren)
- Serum-Albumin vom Rind
- Pertussivakzine / Diphterie -Pertussis - Tetanus Adsorbat-Impfstoff
  alle von Fa. Behringwerke; Marburg

- Nembutal^{R}, Ceva GmbH; Bad Segeberg
- Serum von fätalen Kalb
- Ammoniumhydrogencarbonat purum
- Chloramin-T
- Dinatriumphosphat
- Hydroxylamin-hydrochlorid sulfatfrei puriss
- N-Aethyl-N-(3dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
- Tris-hydroxymethyl-)-aminomethan
- Natriumazid purum
- N,N-Dimethylformamid puriss
- Harnstoff

  alle von Fluka; Buchs (Schweiz)

- Anion Exchange Resin

  AG 1 XP; 1 II - 200 mesh, chloride

  Bio-Rad; Richmond (USA)
- Carbon Decolorizing Neutral Norit, Fa.Fischer; Fair Lawn (USA)
- Norit A - Aktivkohle, Fa. Fisher Scientific; Zürich (Schweiz)
- Dextran T - 70
- Sp Sephadex C-25
- Sephadex G 50

  alle von Fa. Pharmacia; Uppsala (Schweden)

- Freund'sches Adjuvans, komplett und inkomplett, Fa. Paesel;

  Frankfurt bzw. Fa. Sigma; München
- Kaliumjodid, Fa. Riedel de Haen AG; Seelze
- Kochsalz, 0,9 %
- Aqua dest
- Vivasorb-Orange

  alle von Fa. Pfrimmer; Erlangen

- Chappi (Rind) Fa. EFFEM GmbH; Verden
- Trypsin from bovine pancreas
- Dextran-Blau

  beide von Fa. Serva; Heidelberg
- Sodium ^{125}Jodide, Fa. New England Nuclear; Boston (USA)
- Stickstoff, Fa. Linde; Nürnberg
- Thyroglobulin, Bovine Type I, Fa. Sigma; St. Louis (USA)
- Quso G 32, Fa. Bie & Berntsen; Aarhus

Hormone zum Studium der Kreuzreaktion

- porcines Caerulein - Takus^{R}, Fa. Pharmitalia; Freiburg
- humanes Calcitonin, Fa. Ciba; Basel (Schweiz)
- Cholecystokinin-Pankreozymin, Fa. Boots (England über Fa. Paesel; Frankfurt)
- Glukagon krist, Fa. Lilly; Indianapolis (USA)
- Cholecystokinin-Octapeptide
- Gastrin
- Somatostatin
- Vasoactive Intestinal Peptid (VIP)
- human Pancreatic Polypeptide (hPP)

  alle von Fa. Bachem; Bubendorf (Schweiz)

- Humanes-Insulin
- Ratten-Insulin

  alle von Fa. Novo; Kopenhagen (Dänemark)

- Gastric Inhibitory Peptide (GIP), Professor H. D. Becker, Chirurgische Universitäts-Klinik; Göttingen
- Motilin, 13 Nor-Leucin-Analog, Professor Domschke, Medizinische Universitäts-Klinik; Erlangen
- Bovines Parathormon (1-84), hochgereinigt, Fa. Inolex; Chicago (USA)
- Wachstumshormon (Ratte), NIH; Bethesda (USA)

Versuchstiere

- Kaninchen, Weiße Neuseeländer - männliche, Fa. Ziebarth; Sugenheim
- Kaninchen, Laborstamm männlich, Fa. Buchner; Kienberg
- Ratte, Sprague-Dawley - männlich, ca. 250 g, Fa. Gassner; Coburg
- Beagle-Hunde - männlich, Fa. Tierhandel GmbH; Rodenbach

2.1.2 Gerätschaften

- Homogenisator Ultra-Turax, Fa. Jahnke & Kunkel KG; Staufen im Breisgau
- Eppendorf Pipetten
- Zentrifuge 5412 (Mikroliter - System)

  beide von Fa. Eppendorf-Gerätebau Netheler u. Hinz GmbH; Hamburg
- Rüttelgerät
- Vortex-Schüttel-Mischer

  beide von Fa. Heidolph; Kehlheim

- Automatischer Gammaprobenwechsler LB MAG 312
  Fa. Berthold; Wildbad
- Chromatographie-Säulen, Fa. Pharmacia; Uppsala (Schweden)
- Kühlzentrifuge Roto-Silenta K, Fa. Hettich; Tuttlingen
- Ultra-Zentrifuge OTD-65, Fa. Dupont de Nemour; Bad Nauheim
- Elektronische Halbmikrowaage 2004 MP 6, Fa. Sartorius; Göttingen
- Ultra-Lab-Diluter 2075
- Elektrophoresegerät, Eldoplein;
  beide von Fa. LKB; München
- Selecta-Faltenfilter Nr. 595 1/2 ∅ 125 mm; Fa. Schleicher
  und Schüll; Dassel
- Visking tube (=Cellulosenitrat-Membran), MG 10 000, Fa. Serva;
  Heidelberg
- Reagenz und Zentrifugenröhren No. 55.484
- Qualitätsspitzen No. 70762 und 70760
  beide von Fa. Sarstedt; Nümbrecht
- Fontavapor 285, Fa. Büchi; Flawil (Schweiz)
- Magensonde, Charriere 20 (Länge 120 cm), Fa. Chiro-Med.
  Medizin-Technik; Erlangen
- Seitzfilter, Sorte 6, Fa. Deutsche Seitzfilter; Bad Kreuznach
- Muffelofen, Fa. Heraus; Hanau
- Perfusor
- Venofix^{R}, Blutentnahmekanülensystem
- Rekordspritze;
  alle von Fa. Braun; Melsungen
- Gefrierschrank -30 $^{\circ}$ C, Fa. Liebherr; Memmingen
- Kelvinator -80° C
- Wasserbad +4 $^{\circ}$ C
  alle von Fa. Colora; Lorch
- Heizkissen, Fa. Rowenta; Offenbach am Main

2.1.3 Reagentien

Der Aufbau des Radioimmunoassyas (RIA) verlangt die Herstellung folgender Lösungen:

Puffer (= sog. Assay-Puffer) (22)
0.1 M Natriumacetat
3,08 mM Natriumazid
10 mM Titriplex
wurden mit aqua bidest. aufgefüllt und mit 1 M Salzsäure auf den pH-Wert von 4 eingestellt;

Verdünnungsmittel (sog. Assay-Diluent) (22)
Erst unmittelbar vor dem Ansatz wurden zum Assay-Puffer 2,5 Millionen KIE Trasylol und 0.14 mM humanes Serumalbumin (MG ca. 60 000) pro L unter ständigem Rühren hinzugefügt;

Außerdem werden benötigt:

für das Trennverfahren
100 ml Trennmedium enthalten 90 ml Assay-Puffer,
10 ml hormonfreies Plasma, 1,8 g Aktivkohle (Carbon Decolorizing Neutral-Norit) und 0.18 g Dextran T-70;

für die radioaktive Markierung
Phosphatpuffer 0.5 M, 7.4, enthält die Lösungen:
A) 68.04 g Monokaliumphosphat pro Liter, und
B) 89.03 g Dinatriumphosphat pro Liter;
Die Zusammensetzung des 0.5 M Phosphatpuffers, pH 7.4 ist
16 ml A + 84 ml B;

für die elektrophoretische Untersuchung
Phosphatpuffer nach Sørensen (23), pH 7.4
A) 1/15 M Monokaliumphosphat (9.08 g) pro Liter, und
B) 1/15 M Dinatriumphosphat (11.88 g) pro Liter;
Zusammensetzung der Pufferlösung
19.6 ml A + 80.4 ml B
Tracer-Insulin (human) und Tracer-Parathormon 1-84 (bovine)
Chloramin T-Markierung nach Greenwood, Hunter und Glover (24, 25)

2.1.4 Definition sich wiederholender Bezeichnungen

Wenn nicht anders angegeben, sind die unten aufgeführten "Assay-Bestandteile", wie folgt definiert:

Tracer-Total pro Röhre (T): ca 5 000 cpm in 0.1 ml Assay-Diluent

Tracer-Secretin (Tracer) : ca 5 000 cpm in 0.1 ml Assay-Diluent

Kontroll-Röhre für T (TK) : 0.1 ml Tracer und 0.8 ml Assay-Diluent

Antikörper-Arbeitsverdünnung (AV): 1:140 000, aus Serum des Kaninchens 1 der Immunisierungsgruppe 3, Immunisierung mit Sekretin-Thyreoglobulin-Konjugat; 5. Boosterung; Titer 1:73 000; näheres Seite 26.

Bo[1]-Röhre (O): 0.6 ml Assay-Diluent (siehe oben) und 0.2 ml Arbeitsverdünnung (AV), sowie 0.1 ml Tracer

cpm: counts per minute

rpm: rewinds per minute

2.2 Methoden beim Aufbau der radioimmunologischen Bestimmung (RIA) von Sekretin

2.2.1 Produktion von Sekretin-Antiseren

Synthetisches Sekretin ist ein schwaches Antigen, weshalb ausreichende Antigenität erst durch seine Anlagerung an ausreichend starke Antigene (wie Proteine) geschaffen werden muß.

2.2.1.1 Koppelung von Sekretin mit Makromolekülen

Mit Thyreoglobulin

Einzelheiten einer Koppelungs-Reaktion oder Konjugation sind an anderer Stelle beschrieben (26). Vorgelegt werden 0.156 M (ca. 500 µg) synthetisches Sekretin und 0.0026 µM (ca. 156 µg) Thyreoglobulin.

Als Marker für den Grad der Koppelung wurde 200 µl Tracer-Sekretin (ca. 1 Million cpm) zugegeben, anschließend die eigentliche Koppelung durch Zugabe von 0.2912 µM N-Aethyl-N-carbodiimid-hydrochlorid (CDI) (56 µg/15 µl Aqua bidest.) eingeleitet. Das Gemisch wurde geschüttelt (Vortex-Schüttel-Mischer) und bei Raumtemperatur 18 Stunden inkubiert.

[1] Bo = [cpm Antikörper gebunden (O) - cpm unspezifisch gebunden (TK bzw. C)] : cpm Tracer (T) × 100

Dann erfolgte die Zugabe von 0.2 ml 1.0 M Hydroxylamin und eine weitere 5-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Gemisch in einen Sack aus Cellulosennitrat-Membran (Auschlußgrenze ca. MG 10 000) eingefüllt und bei 4 ° C gegen 200 ml Aqua bidest. für 24 Stunden diaysiert.

Mit bovinem Serumalbumin

Das schwache Antigen Sekretin (0.33/uM; ca. 106/ug) wurde mit 0.029/uM (1740/ug) bovinem Serumalbumin (BSA, MG ca. 60 000) als starkes Antigen in 0.2 ml N,N-Dimethylformamid und 1 ml 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4, unter Schütteln in Lösung gebracht (27).
Als Marker für den Grad der Koppelung wurde 100/ul Tracer (ca. 0.5 Millionen cpm) zugegeben. Das Ganze wurde unter Schütteln für 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
Anschließend wurde das Gemisch in Cellulosenitrat (s. o.) eingefüllt und bei 4 ° C gegen 0.05 M Phosphatpuffer pH 7.4 dialysiert. Die Einbaurate in Prozent wurde anhand der im Dialyseschlauch und in der Dialyseflüssigkeit gezählten cpm errechnet.
Alle Dialysate wurden bei -20 ° C eingelagert.

2.2.1.2 Immunisierung von Kaninchen

Allgemein

Immunisiert wurden weiße, männliche Neuseeland-Kaninchen. Multiple intra- und subkutane Injektionen wurden am geschorenen Rücken gesetzt.

Impfungen

Insgesamt wurden 4 Gruppen Kaninchen mit unterschiedlichen Antigen geimpft.

Gruppe 1 (n = 3): Sekretin-Thyreoglobulin-Konjugat

Pro einzelner Impfung und pro einzelnem Kaninchen wurden 52 nM synthetisches Sekretin (gelagert ca. 5 Jahre bei -20 ° C; entsprechend 91.6/ug Konjugat), 116/ul Pertussisvakzine und 400/ul Freund'sches Adjuvans "komplett" emulgiert und dieses Material verabreicht.
Ab der 6. Impfung (5. Boosterung) wurde Freund'sches Adjuvans "inkomplett" verwendet, ab der 7. Impfung (6. Boosterung) wurden 39 nM unkonjugiertes Sekretin, gemischt mit 125/ul 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4, und 300/ul Freund'sches Adjuvans, als Emulsion injiziert.

Die Impfungen 1 - 8 wurden 14-tägig, die restlichen 5-monatlich durchgeführt.

Gruppe 2 (n = 1): Unkonjugiertes Sekretin
Die Impfdosis enthielt bis zur 4. Impfung (3. Boosterung) 15.6 nM Sekretin (50 µg) gelöst in 300 µl 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4, 350 µl Freund'sches Adjuvans komplett, dann Freund'sches Adjuvans inkomplett.
Die 1. Boosterung erfolgte 14 Tage nach der 1. Immunisierung, die weiteren Boosterungen erfolgten in monatlichen Abständen.

Gruppe 3 (n = 1): Sekretin-Thyreoglobulin-Konjugat
Die Impfdosis enthielt 15.6 nM lyopilisiertes Sekretin (50 µg/150 µl Sekretin-Konjugat), 125 µl Pertussis-Vakzine und 400 µl Freund'sches Adjuvans "komplett".
Die 1. Boosterung erfolgte nach 14 Tagen, die folgenden in monatlichen Abständen.
Ab der 5. Impfung (4. Boosterung) wurden 15.6 nM unkonjugiertes Sekretin (50 µg), gemischt mit 300 µl 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4 und 350 µl Freund'sches Adjuvans "inkomplett", verabreicht.

Gruppe 4 (n = 3): Sekretin-BSA-Konjugat
Bei der ersten Impfung wurden 28 nM Sekretin (90 µg/117 µl Sekretin-Konjugat) mit 233 µl Freund'sches Adjuvans, "komplett", intracutan verabreicht.
Pro Boosterung wurden 15.6 nM Sekretin (50 µg/65 µl Sekretin-Konjugat) gemischt mit 233 µl Freund'sches Adjuvans "inkomplett", subcutan, monatlich verabreicht.

2.2.1.3 Gewinnung von Seren

10 - 12 Tage nach jeder Boosterung wurden die Kaninchen mit einer Venofix^{R} Kanüle aus der Ohr-Vene geblutet. Das Blut wurde in eisgekühlten Kunststoffröhren aufgefangen, 2 Stunden bei 4 ^{o} C gelagert und anschließend bei 4 ^{o} C und 3 000 rpm zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde in 50 µl Aliquots (pro Eppendorf-Röhre) abgepackt und bei -20 ^{o} C gelagert.

2.2.1.4 Bestimmung des Titers von Seren

Unter Titer versteht man jene Verdünnung eines Antiserums, bei

welcher 50 Prozent des eingesetzten Tracers gebunden werden. Für die Feststellung des Titers wurde pro Serum eine ansteigende Verdünnung erstellt, beginnend bei 1:8 (1 Teil Serum plus 7 Teile Assay-Diluent), 1:16, 1:32 usw.. Folgende Röhren wurden dreifach angesetzt: die Totalröhre (T), die Kontrollröhre für T (TK) und die Bo-Röhre (O). Der Tracer wurde sofort zugegeben. Der gesamte Arbeitsgang wurde im Wasserbad bei 4 ° C durchgeführt, und in einer Kühlzelle (4° C) für 24 h inkubiert. Die Trennung der antikörpergebundenen Fraktion des Tracers von der freien Tracer-Fraktion erfolgte mittels dextranbeschichteter Aktivkohle, (siehe dazu Absatz "Trennverfahren", Seite 17). Aus diesen Untersuchungen zum jeweiligen Tier wurde pro Immunisierungsgruppe jenes Serum mit dem höchsten Titer ausgewählt und später (in einer Sekretin-Standardkurve) näher untersucht.

2.2.1.5. Lagerung von Serum für den Radioimmunassay

Erfahrungsgemäß bedingt die Lagerung in höheren Vor-Verdünnungen bzw. bei Temperaturen zwischen -20 ° C und -30 ° C einen Verlust an Titer und Affinität zum Antigen (Sekretin). 40 µl des Serums der Immunisierungsgruppe 3, Sekretin-Thyreoglobulin-Konjugat. 5. Boosterung, Titer 1:73 000 (siehe "Bestimmung des Titers von Seren", Seite 28) wurde daher mit Assay-Diluent auf 200 ml (Verdünnung 1:5 000) aufgefüllt und in 0.5 ml-Fraktionen in Polystyrol-Röhren pipettiert, diese verschlossen und bei -80 ° C tiefgefroren. Die tiefgefrorenen Röhren wurden anschließend gefriergetrocknet und bei -20 ° C gelagert.

2.2.2. Markierung von Sekretin (24,25)

Wir benutzten folgende Substanzen für die Reaktion: ^{125}J-Na wurde mit 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4, so aufgefüllt, daß 10 µl 1 mCi beinhalten; das Chloramin-T in 0.5 M Phosphatpuffer, pH 7.4; das humane Serumalalbumin und das Kaliumjodid in 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4; Sekretin (synthetisch und das DATA[1]-Analog), gelöst zu je 5 µg in 5 µl 0.001 M Essigsäure, gelagert bei -20 ° C in Eppendorf-Röhren. NaJ^{125}, Sekretin und Chloramin - T wurden

[1]DATA: Desaminotyrosyl-ß-alanyl-secretin

in eine Eppendorf-Röhre pipettiert und für eine Minute mit einer Pipettenspitze gemischt. Die Reaktion wurde mit humanen Serumalbumin (14 mg/200 µl 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4) gestoppt, anschließend wurden noch Kaliumjodid (200 µg/100 µl 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4) dazugegeben.
Das synthetische Sekretin und das DATA-Sekretin waren in Eppendorf- Röhren zu je 5 µg/5 µl 0.001 M Essigsäure gelöst. Die Eppendorf-Röhre aus dem DATA-Sekretin für die Ansätze e und f (s.Tab 1) entnommen wurde, wurde mit 20 µl 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4 aufgefüllt, sodaß 1 µg DATA-Sekretin 5 µl entsprachen. Da die im Test vorherrschende Konzentration von Hormon und Oxydans (Chloramin-T) limitierend ist für die Einbaurate von ^{125}J-Na (spezifische Aktivität) und das sog. "Jodination damage", wurde die in Tab. 1 aufgelisteten Ansatzvarianten als Basis untersucht, um die unterschiedliche Brauchbarkeit von radioaktiven Salz bzw. der Peptidhormon-Präperation zu studieren.

Tab. 1 : Ansatzvarianten der Markierung von Sekretin

Variante	^{125}J-Na Behring	^{125}J-Na NEN	Sekretin synthetisch	Sekretin DATA
a)	1 mCi/10 µl		5 µg/5 µl	
b)		1 mCi/10 µl	5 µg/5 µl	
c)		1 mCi/10 µl		5 µg/5 µl
d)		1 mCi/10 µl		2 µg/2 µl
e)		1 mCi/10 µl		1 µg/5 µl
f)	1 mCi/10 µl			1 µg/5 µl

Chloramin-T (5 µg/5 µl), Serumalbumin (14 mg/200 µl) und Kaliumjodid (200 µg/100 µl) wurden bei allen Varianten unverändert zugegeben.

2.2.3 Reinigung von markiertem Sekretin

2.2.3.1 Auf Sephadex (Gel-Chromatographie)

Die Reaktionsmischung wurde bei 4 ° C auf eine Säule von Sephadex G 50, superfine (0.9 cm x 55 cm), aufgetragen und mit 0.25 M Ammoniumhydrogenkarbonat, enthaltend 72.5 µM Serumalbumin vom Rind, pH 8.0, mit einer Flußrate von 9 ml/h eluiert. Jene Fraktionen, welche die höchste Radioaktivität innerhalb V_o [1)] und V_t [1)] enthielten, wurden aliquotiert und bei -20 ° C in Eppendorf-Röhren eingefroren.

2.2.3.2 Auf SP Sephadex (Ionenaustausch-Chromatographie)

Die Reaktionsmischung wurde bei 4 ° C auf eine Säule Sp Sepahdex C 25 (0.9 x 28 cm) aufgetragen und mit einer Lösung von 0.15 M Natriumacetat, pH 5.0 enthaltend 45 µM humanes Serumalbumin und 0.5 Millionen KIE Trasylol/L mit einer Flußrate von 2 ml/h eluiert. Die Peakfraktionen (s. oben) wurden aliquotiert und bei -20 ° C eingefroren.

2.2.3.3 Einbaurate von radioaktiven Salz und spezifische Aktivität des im Radioimmunoassay verwendeten Tracers

Die Ausbeute an markiertem Sekretin ist definiert als das Material, welches innerhalb jenes Gipfels an Radioaktivität eluiert, welcher sich als ausreichend immunoreaktiv herausstellt (siehe Absatz "Wahl der Tracerdosis für den Assay", Seite 16). Die Angabe erfolgte in Prozent (1 mCI ^{125}J-Na bzw. eingesetzte Salz-Menge = 100 Prozent).
Die spezifische Radioaktivität (µCi/µg) bezeichnet das Verhältnis von eingesetzter Radioaktivität (= µCi) zur Masse (= µg) des eingesetzten Hormons.

2.2.3.4 Lagerung und Weiterverarbeitung des markierten Sekretins

Vom Peak des Tracer-Sekretins wurden die Fraktionen des ansteigenden Schenkels (ca. 6 ml), die Peak-Radioaktivität (ca. 2 ml) und die Fraktionen des absteigenden Schenkels (ca. 6 ml) gepoolt und so aliquotiert, daß eine Eppendorf-Röhre ca. 2 - 3 Millionen cpm enthielt; ein gleiches Volumen Anion-Exchange-Resin

[1)] V_o: Säulen-Volumen; V_t: Salz-Volumen (für ^{125}J-Na)

(A 6 x 8; 1 II - 200 mesh) wurde hinzugefügt, das Ganze bei -20 ° C gelagert.
Nach Auftauen wurde dieses Resin-Tracer-Gemisch für 30 Sekunden geschüttelt (Vortex-Schüttel-Mischer), ein gleiches Volumen Assay-Diluent hinzugefügt, nochmals geschüttelt und für 30 Sekunden in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Röhrchen abpipettiert, das ca. 1/2 Volumen dieses Überstands an Resin enthielt. Anschließend wurde wieder geschüttelt und geschleudert. Dieser Überstand wurde als gereinigtes Tracer-Sekretin betrachtet und mit Assay-Diluent auf ca. 5 000 cpm/0.1 ml eingestellt.

2.2.4 Bewertung der Schädigung von markiertem Sekretin

2.2.4.1 Das sog. "jodination damage"

2.2.4.1.1 Durch Talk-Resin-Trichloressigsäure-Test

Da das Talkum intaktes Hormon adsorbiert (28), läßt sich mit Hilfe des Tests bestimmen, welcher Anteil der Radioaktivität dem Tracerhormon entspricht. Durch das Resin werden freie Jodide (aus Dejodierung) und saure Aggregate des Hormons adsorbiert (28). Die Trichloressigsäure fällt Peptidhormone aus, d. h. die Radioaktivität im Fällungsprodukt entspricht dem Anteil an vorhandenem Hormon.
Je ein Aliquot der zu untersuchenden Peaks wurde mit Assay-Puffer, enthaltend 1 % Serumalbumin vom Rind, auf ca. 5 000 Cpm/0.1 ml eingestellt.
Pro Peak wurden jeweils drei Röhren mit 100 mg Talkum, drei mit 150 mg Anion-Exchange-Resin, drei mit 1 ml 10 % Trichloressigsäure beschickt.
Alle Röhren wurden mit 0.9 ml Assay-Puffer und 0.1 ml Peakaliquots (eingestellt auf ca. 5 000 cpm) versehen, für 20 Sekunden geschüttelt, anschließend die Innenwände der Talkum- und Resin-Röhren mit 1 ml Assay-Puffer nachgewaschen, bei 3 000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

2.2.4.1.2 Durch Prüfung der Bindungsfähigkeit von Tracer an Exceß-Antikörper-Konzentration

Es wurden je dreimal die T-Röhre, TK-Röhre, die Röhren für die unspezifische Bindung von Tracer (UB) an Serum (0.6 ml

Assay-Diluent; 0.2 ml normales Kaninchenserum, von mindestens drei Tieren gepoolt) und die O-Röhren (hier mit 0.2 ml Antiserum von Kaninchen 1, der Immunisierungsgruppe 3, 5. Boosterung) zum Vergleich angesetzt. Der Tracer wurde sofort zugegeben. Der Ansatz und die Inkubation wurden bei 4 ° C durchgeführt, die Inkubation betrug 24 h.

2.2.4.2 Das "incubation damage" mittels Elektrophorese

Die Kammern des Elektrphoesegerätes waren mit dem Phosphat-Puffer nach Sørensen, pH 7.4 (23), gefüllt. Auf jeweils einen Papierstreifen wurden 20 µl aufgetragen. Dieses Material ist identisch, mit der im eigentlichen RIA verwendeten Tracerzugabe (Einzelheiten siehe unten).
An dem Gerät lag eine Spannung von 400 Volt. Die Laufzeit betrug einmal 30 Minuten und einmal 60 Minuten. Anschließend wurden die feuchten Papierstreifen im Ofen getrocknet, in 1 cm Einheiten zerschnitten und gezählt.

Folgende Ansätze wurden untersucht:

2.2.4.2.1 Tracer-Inkubation in verschiedenen Verdünnungsmitteln

Zu jeweils 0.1 ml Tracer und 0.7 ml Assay-Diluent wurden einmal 0.1 ml Plasma, enthaltend Trasylol und EDTA[1)], einmal 0.1 ml Plasma-Quso behandelt[2)] und einmal 0.1 ml Seretin-Quso-behandelt, gegeben.

2.2.4.2.2 Verdauungstest mit Trypsin

Das pH-Optimum für Trypsin liegt bei 7.5 - 8.5; unser RIA (siehe Absatz "Einfluß unterschiedlicher Verdünnungsmittel auf die Standardkurve"; Seite 17) arbeitet aber im Bereich pH 4.

1) Einzelheiten s. Absatz: "Nüchtern-Blutentnahme beim Versuchstier, und beim Menschen - Basales Plasma Sekretin", Seite 25.

2) Zum Zweck der Entfernung der enthaltenen Hormone wurde Seretin bzw. Plasma mit 10 mg Quso/ml 20 Minuten gerührt, mit 20 000 rpm geschleudert, durch Faltenfilter vorgereinigt und unter Überdruck durch Seitzfilter nachfiltriert.

Wir setzten deshalb 0.1 ml Tracer mit 0.8 mg Trypsin (aus bovinem Pankreas) einmal in 0.8 ml Assay-Diluent pH 4 und einmal in 0.8 ml 0.25 M Ammonium-Hydrogenkarbonat-Puffer, pH 8, mit 72 µM Serumalbumin vom Rind an. Jeweils ein Ansatz wurde vor der elektrophoretischen Untersuchung 24 h bzw. 48 h bei 4 °C inkubiert.

2.2.5 Herstellung von hormonfreiem Plasma

Vier bis sechs Wochen altes Bankplasma von wenigstens fünf verschiedenen Blutspendern wurde zunächst gepoolt, durch Passage über Faltenfilter vorgereinigt, mit 10 mg/ml Quso versetzt, 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und bei 20 °C mit 20 000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals über Faltenfilter gereinigt und anschließend mit Seitzfilter (3 - 5 bar Überdruck) filtriert und bei -20 °C tiefgefroren.

2.2.6 Bedingungen für den Radioimmunoassay von Sekretin

2.2.6.1 Antikörper und Affinität zwischen Antikörper und Sekretin

Für den RIA wählten wir das Serum des Kaninchen 1 aus der Immunisierungsgruppe 3 (Sekretin-Thyreoglobulin-Konjugation), 5. Boosterung, Titer 1:73 000. Wir arbeiteten mit einer Arbeitsverdünnung von 1:140 000, was einer Endverdünnung von 1:630 000 entspricht.
Weiterhin studierten wir aus der gleichen Immunisierungsgruppe 3, das Serum des Kaninchen 1, 4. Boosterung, Titer von 1:18 000 in einer Arbeitsverdünnung von 1:80 000 (Endverdünnung 1:360 000), sowie das Serum des gleichen Tieres nach der 6. Boosterung, Titer 1:36 000, mit einer Arbeitsverdünnung von 1:80 000 (Endverdünnung 1:360 000). Die Affinitätskonstante (Ko) des Antiserums wurde durch Auftragung der gebundenen Tracerphase (= X-Achse) und des Verhältnisses der gebundenen zur freien Phase des Tracers (= Y-Achse) in einem sog. Scatchard plot (29) bestimmt.

2.2.6.2 Wahl der Tracerdosis für den Assay

Um die optimale Tracerdosis zu erfahren, wurden Tracerzugaben von 2 200 cpm, 4 500 cpm, 9 000 cpm, 18 000 cpm, 36 000 cpm/0.1 ml Assay-Diluent studiert. Der Ansatz erfolgte dreifach in den Röhren T, TK 0. Die Arbeitsverdünnung des Antikörpers betrug 1:70 000.

Der Ansatz und die Inkubation wurden bei 4 ° C durchgeführt, die Inkubationszeit betrug 24 Stunden.

2.2.6.3 Einfluß unterschiedlicher Verdünnungsmittel auf die Standardkurve

Vielfache Vorversuche zeigten, daß die Interaktion zwischen Standard- und Tracer-Sekretin einerseits und Antikörper andererseits, ganz elementar abhängig ist vom gewählten Inkubationsmilieu (pH, Ionenstärke, Proteinzusatz, Proteinase-Hemmern). Hierfür sind sehr unterschiedliche Faktoren verantwortlich (s. auch Diskussion). Wir studierten deshalb 3 Verdünnungsmittel genauer, deren Brauchbarkeit von anderen Laboratorien berichtet wurde:

- Assay-Diluent nach Tai und Chey (13):
  0.05 M Tris-HCl, pH 7.8; 0.1 % BSA; 2.5 % Trasylol;
- Assay-Diluent nach Yalow und Straus (30) :
  0.02 M 5.5 Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz (Barbital-Natrium), pH 8.6; 2.0 % Serum vom fötalen Kalb (zuvor wurden durch Erhitzen während 30 Minuten bei 60 ° C Proteine inaktiviert; 500 K.I.U. Trasylol pro ml;
- Assay-Diluent nach Burhol und Waldum (22): pH 4.0; Einzelheiten siehe Absatz "Reagentien", Seite 7)

Die Inkubationszeit vor der Tracerzugabe betrug 72 h, jene nach Tracer-Zugabe 24 h (s. auch folgenden Abschnitt), d. h. die gesamte Inkubationszeit war 96 h. Alle Ansätze wurden bei 4 ° C durchgeführt. Das Trennverfahren erfolgte wie im Absatz "Trennverfahren" (s.unten) beschrieben, aber mit dem jeweiligen Assay-Puffer.

2.2.6.4 Abhängigkeit der Tracerbindung an den Antikörper von der Inkubationszeit

Es wurden T-Röhren und O-Röhren (AV = 1:140 000) je dreimal angesetzt und der Tracer sofort zugegeben. Die Trennung der an den Antikörper gebundenen Fraktion des Tracers von der freien Fraktion wurde nach einer Inkubationszeit von entweder 3, 6, 9, 12, 18 oder 24 h durchgeführt.

2.2.6.5 Trennverfahren

Tiefgefrorenes hormonfreies Plasma wurde aufgetaut, über Seitz-

filter unter Stickstoffdruck von 3 - 5 bar gereinigt und 24 h bei 4 °C gegen 500 ml Kochsalz im Cellulosenitratsack dialysiert. 90 ml Assay-Puffer, pH 4.0, wurden mit 1.8 g Aktivkohle und 0.18 g Dextran T-70 (s. auch folgenden Abschnitt) für 24 h bei 4 °C gerührt. 30 Minuten vor der Zugabe des Trennmediums zu den Reaktionsröhren wurden das Plasma und die Kohle-Dextran-Suspension zusammengegeben und bis zur Zugabe gerührt. Pro Röhre wurde 1 ml Trennmedium zugegeben; nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4 °C wurde mit 3 000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt.

2.2.6.6. Abhängigkeit der Tracerbindung von der Kohle-Dextran-Menge

Für jede Stufe der Kohle-Dextran-Konzentration wurden eine T, TK-, O-Röhre jeweils dreimal angesetzt. Nach einer Inkubation von 24 h bei 4 °C wurde pro Stufe Kohle-Dextran-Konzentration um 6 mg Kohle und 0.6 mg Dextran pro ml Trennflüssigkeit gesteigert, beginnend bei Stufe 1 mit 6 mg/ml Kohle und 0.6 mg/ml Dextran, endend bei Stufe 10 mit 60 mg/ml Kohle und 6 mg/ml Dextran.

2.2.6.7 Ansatz der Standardkurve

Wir setzten jeweils drei Röhren von T, TK, C und O an. Die C-Röhre (für die Kontrolle der unspezifischen Bindung) enthielt 0.7 ml Assay-Diluent und 0.1 ml Standardlösung des Standardpunktes 8 (500 pg Sekretin/0.1 ml).
Alle Standardpunkte (1-11) der Kurve wurden dreifach so angesetzt, daß immer 0.5 ml Assay-Diluent, 0.2 ml Antikörper-Arbeitsverdünnung, sowie 0.1 ml der jeweiligen Standardverdünnung in einem Pipettierschritt mittels automatischem Pipettiergerät zugegeben wurden. Die Standardverdünnungsreihe erstreckte sich von Punkt 1 - 11.

Die Punkte entsprechen folgenden Konzentrationen:

Punkt	1:	0	pg/ml
"	2:	6.125	"
"	3:	12.5	"
"	4:	25.0	"
"	5:	50.0	"
"	6:	100.0	"
"	7:	250.0	"
"	8:	500.0	"
"	9:	1000.0	"
"	10:	2000.0	"
"	11:	5000.0	"

2.2.6.8 Optimierung der Inkubationszeiten, d. h. bei sofortiger Tracerzugabe bzw. bei dessen zeitlich versetzter Zugabe (sog. Dysäquilibrium-System)

Als optimale Inkubationsperiode des RIA-Systems wurde jene betrachtet, bei welcher in Gegenwart von ausreichend hoher Tracer-Bindung (in Anwesenheit von Standard-Sekretin) ein maximal empfindliches Meß-System (= steiler Kurvenabfall) beobachtet wird. Folgende Versuchsserien wurden studiert (die Zahl vor dem Querbalken ist die Inkubationszeit in Stunden, vom Ansatz bis zur Tracerzugabe, die Zahl danach ist die Zeit von der Tracerzugabe bis zum Trennverfahren):

0/24 - 0/30 - 0/48

6/48 - 12/48 - 18/48 - 24/48 - 30/48 - 36/48 - 42/48 - 48/48

48/18 - 48/24 - 48/30 - 48/36 - 48/42 - 48/48

72/18 - 72/24 - 72/30

Diese Untersuchungsserie wurde mit dem Serum des Kaninchen 1 der Immunisierungsgruppe 2 (unkonjugiertes Sekretin), 3.Boosterung, bei einer Verdünnung von 1:290 000, durchgeführt.

2.2.6.9 Reproduzierbarkeit der Standardkurve

Trotz gleichbleibender äußerer Bedingungen für den praktischen Ablauf des Radioimmunoassay lassen sich mäßige Verschiebungen des Kurvenverlaufs von Ansatz zu Ansatz nicht vermeiden (= sog. Interassay-Variation) .

Aus diesem Grund wurden an 16 Tagen jeweils 1 Sekretin-Standardkurve zur jeweils gleichen Tageszeit angesetzt. Um die aus zeitlich verschiedenen Sekretin-Markierungen resultierende, mäßig abweichende Bo besser zu kontrollieren, wurde zu den 16 Kurven Tracer-Sekretin aus insgesamt 4 Markierungen verwendet.

2.2.6.10 Sensitivität der Standardkurve

Die Sensitivität der Sekretin-Standardkurve entspricht der "minimalen meßbaren Menge" (= detection limit).
Sie ist jene Menge Testsubstanz, welche der unteren 2 SD[1)]-Grenze des Punktes B/Bo x 100[2)] entspricht, d. h. mit ausreichendem Vertrauen als different von Null (Sekretin) betrachtet werden kann.

2.2.7 Quantifizierung von Sekretin pro Standarddosis Tracer mittels Hemmkurve

Die mit Tracer pro Röhre zugegebene Sekretinmenge wurde aus einer Selbsthemmkurve (31) bestimmt. Bei diesem Verfahren wurde die Abnahme der Bo mit steigender Tracermenge bestimmt und diese Selbsthemmung des Tracers mit der Tracer-Hemmung durch (kaltes) Sekretin (= Standardmaterial) verglichen. In einer Dreifach-Bestimmung gaben wir steigende Mengen von Tracer, beginnend bei 1 000 cpm/0.1 ml und endend bei 270 000 cpm/0.1 ml, jeweils zu T, TK und C-Röhre. Der Ansatz wurde 24 h bei 4 ° C inkubiert und das Trennverfahren, wie im Ansatz "Trennverfahren" (s. Seite 17) beschrieben, durchgeführt.

2.2.8 Kreuzreaktionen des Sekretin-Radioimmunoassay mit anderen Hormonen

Unter hoher Spesifität eines Antikörpers versteht man das Fehlen einer Kreuzreaktion mit Substanzen, welche strukturell mehr oder minder verwandt sind mit jener, gegen welche (als sog. Antigen) der in Rede stehende Antikörper produziert wurde.

1) SD: Standardabweichung

2) wobei für B, die Punkte 1 - 11 der Standardverdünnungsreihe gesetzt werden; für Bo immer Punkt 1, siehe Seite 17.

Die untersuchten Proteo-Hormone und Peptid Hormone (s. unten) wurden analog einer Standardkurve (siehe Absatz: "Ansatz der Standardkurve" Seite 18) studiert, d. h. statt Sekretin-Standard wurde das betreffende Hormon eingesetzt und zusätzlich Mehrfache der höchsten Standard-Dosis einer Sekretin-Standardkurve. Hormon bzw. Peptide: Caerulein; Calcitonin; Cholecystokinin-Octapeptid; Cholecystokinin-Pankreozymin; Gastrin; Gastric Inhibitory Peptide (GIP); Glucagon; Insulin (human); Insulin (Ratte); Motilin; bovines PTH (1-84); Pankreatisches Polypeptid (PP); Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP); Wachstumshormon (Ratte).

2.3. Bestimmung von Sekretin im Plasma[1)]

2.3.1 Bestimmung der Adsorption von Tracer-Sekretin an Quso im Plasma

Diese Serie an Voruntersuchungen wurde nötig, weil einerseits sekretinfreies Plasma in großeren Mengen im Rahmen des Sekretin-RIA verwendet werden muß, andererseits im Plasma offenbar hohe Anteile an unspezifischer,d. h. nicht vom Sekretin stammender, Immunoreaktivität enthalten ist. Besonders diese letztere große Fehlerquelle (fälschlich hohe Meßwerte auch in Abwesenheit von "wahrer" Sekretin-Immunoreaktivität) plagt die bisherigen Sekretin-RIAs. Sie ist aber auch durch Extraktion des Plasma nicht völlig zu umgehen (siehe Absatz "Extraktionsverfahren", Seite 23). Eine Eppendorf-Röhre enthält 1 ml Trasylol-EDTA-Plasma, 15 mg Quso und 0.1 ml Sekretin-Tracer. Die Eppendorf-Röhre wurde geschüttelt, bei 4 ^{o} C für 20 Minuten gerüttelt und in der Eppendorfzentrifuge 2 Minuten geschleudert. Die Tracer-Adsorption an Quso ist die Differenz zwischen den cpm im Pellet und den cpm im abpipettierten Überstand.

2.3.2 Plasma-Sekretin durch Differenzberechnung

Ausgehend von der Überlegung, daß nach Quso-Behandlung einer gegebenen Plasma-Probe in deren Überstand nur noch unspezifische Sekretin-Immunoreaktivität meßbar sein würde, strebten wir die

1) Verwendet wurde ein Pool aus Nüchtern-Plasma von Beagle-Hunden (n=16), über Vorbereitung und Behandlung siehe Absatz "Nüchtern-Blutentnahme beim Versuchstier und Menschen - Basales Plasma-Sekretin, Seite 25.

Erfassung von Plasma-Sekretin wie folgt an: die Differenz zwischen gesamter Immunoreaktivität, d. h. ohne Quso-Vorbehandlung, und jener Immunoreaktivität nach Quso-Behandlung ergibt "wahre" Immunoreaktivität. Vorausgesetzt wird, daß Quso nicht nur Tracer-Sekretin (s. oben), sondern auch (endogenes) Sekretin adsorbiert (s. auch Absatz "Adsorption von synthetischem Standard-Sekretin an Quso", Seite 23)

2.3.2.1 Quso-Behandlung von Plasma

Darunter verstehen wir die Zugabe von 1 ml Gemisch Plasma-Trasylol-EDTA in eine mit 15 mg (durch Einwaage) versehene Eppendorf-Röhre. Das Plasma-Quso-Gemisch wurde bei 4 ° C für 30 Minuten auf einem Rüttler homogenisiert und anschließend für 2 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge geschleudert.

2.3.2.2 Aufbereitung von Plasma bzw. Quso-Plasma[1)] für den Probenansatz

Je ein Teil Plasma bzw. Quso-Plasma und ein Teil Assay-Diluent wurden gemischt und für 5 Minuten bei 4 ° C und 3 000 rpm geschleudert. Der jeweilige Überstand wurde für den Ansatz verwendet.

Wir setzten C - (= Kontrolle) und P - (= Proben) Röhren an. Die C-Röhre enthielt 0.5 ml Assay-Diluent und 0.2 ml aufbereitetes Plasma bzw. Quso-Plasma; die P-Röhre enthielt 0.4 ml Assay-Diluent, 0.2 ml Antikörperverdünnung und 0.2 ml aufbereitetes Plasma bzw. aufbereitetes Quso-Plasma. Dies bedeutet, daß pro Plasmaprobe 8 Röhren angesetzt werden; der Gesamtverbrauch an Plasma beträgt deshalb (0.45 ml pro Bestimmung).

2.3.2.3 Wiederfindung von synthetischem Standard-Sekretin

Ansatz und Behandlung geschahen wie unter Absatz "Quso-Behandlung" (s. oben) und Absatz "Aufbereitung von Plasma bzw. Quso-Plasma für den Probenansatz" (s. oben), beschrieben, außer, daß bei der Plasma- bzw. Quso-Plasma-Aufbereitung in 100 µl Assay-Diluent 250 pg synthetisches Standard-Sekretin enthalten war.

[1)] Plasma, vorbehandelt mit Quso, wird im Folgenden als "Quso-Plasma" bezeichnet

2.3.2.4 Adsorption von synthetischem Standard-Sekretin an Quso

Ansatz und Behandlung erfolgten wie unter Absatz "Aufbereitung von Plasma bzw. Quso-Plasma" (s. Seite 22) für Plasma beschrieben, außer, daß pro 100 µl Plasma, 1,5 mg Quso und 250 pg Standard-Sekretin pro 100 µl Assay-Diluent zugegeben wurden.

2.3.2.5 Reproduzierbarkeit der Bestimmung von gepoolten humanem Plasma

Humanes Plasma von 10 Blutspendern wurde wie unter Absatz "Nüchternblutentnahme beim Versuchstier und Menschen - Bsales Plasma - Sekretin", (s. Seite 25) beschrieben, behandelt, gepoolt und bei -20 ^{o} C eingefroren. Eine Doppelprobe Plasma bzw. Plasma-Quso wurde in 11 verschiedenen Ansätzen und einmal 9 Doppelproben Plasma bzw. Plasma-Quso in einem Ansatz mittels Differenzberechnung (s. oben) bestimmt.

2.3.3 Extraktionsverfahren

Vielfach vorgeschlagen als Methode, unspezifische Beeinflussung der Immunoreaktivität zu umgehen (13, 14, 15, 30) , untersuchten wir die Auswirkung der Extraktion von Plasma auf das meßbare Sekretin.
Drei Extraktionsmittel wurden benutzt:
Äthanol 75 % (75 Teile Äthanol und 25 Teile Wasser); Aceton 99.5 %; Methanol 99.8 %.

2.3.3.1 Effizienz der Extraktion von Tracer-Sekretin aus Plasma

Eine Röhre enthielt 0.25 ml Trasylol-EDTA-Plasma, 0.1. ml Tracer-Sekretin und 0.5 ml Methanol bzw. Aceton bzw. Äthanol. Diese Mischung wurde 20 Sekunden geschüttelt und bei 4 ^{o} C für 5 Minuten bei 3 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in der Glasröhre mit 0.3 ml Methanol bzw. Aceton-Wasser (7 Teile zu 3 Teilen), bzw. Äthanol vermischt, geschüttelt und zentrifugiert, der Überstand wiederum abpipettiert. Dieser Vorgang wurde zweimal ausgeführt. Die Extraktions-Effizienz (in Prozent) errechnet sich aus der Differenz der ge-

samten zugegebenen cpm und den cpm im jeweiligen Überstand.

2.3.3.2 Extraktion von Plasma

Eine Glasröhre enthielt 0.25 ml EDTA-Trasylol-Plasma und 0.5 ml Methanol, bzw. Aceton, bzw. Äthanol. Das Gemisch wurde 20 Sekunden geschüttelt, bei 4 ° C für 5 Minuten bei 3 000 cpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das in der Glasröhre verbliebene Pellet wurde mit 0.3 ml Methanol bzw. Aceton-Wasser (7 Teile zu 3 Teilen) bzw. Äthanol geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand wiederum abpipettiert. Dieser Vorgang wurde zweimal ausgeführt. Anschließend wurden die Glasröhren eisgekühlt und im Stickstoffstrom eingedampft. Die Rekonstitution für den Assay erfolgte mit 0.25 ml Assay-Diluent. Zum rekonstituierten Extrakt wurde ein gleiches Volumen Assay-Diluent gegeben, kurz geschüttelt und dann 5 Minuten bei 4 ° C und 3 000 rpm geschleudert.
Wir setzten C- und P-Röhren an, die C-Röhre enthielt zunächst bereits 0.6 ml, die P-Röhre 0.4 ml Assay-Diluent, zusätzlich 0.2 ml Antikörperverdünnung. Zu beiden Röhren wurde dann 0.2 ml des obigen Extrakts gegeben.

2.3.3.3 Einfluß der Extraktion auf die Sekretin-Immunoreaktivität und die Wiederfindung von synthetischem Standard-Sekretin

Sekretinzugabe vor der Extraktion von synthetischem Standard-Sekretin: die Durchführung erfolgte wie unter Absatz "Extraktion von Plasma" (s. oben) beschrieben, aber die Glasröhre enthielt bereits 250 pg synthetisches Standard-Sekretin, gelöst in 100 µl Diluent.
Sekretinzugabe nach der Extraktion: der Ansatz erfolgte wie unter Absatz "Extraktion von Plasma" (s. oben) beschrieben, aber jetzt enthielt das für die Rekonstitution verwendete Assay-Diluent zusätzlich 250 pg synthetisches Sekretin pro 100 µl.

2.3.3.4 Bewertung der unspezifischen Sekretin-Immunoreaktivität im Plasma

Der Ansatz erfolgte wie unter Absatz "Extraktion von Plasma" (s. oben) beschrieben, aber das für die Rekonstitution verwendete Assay-Diluent enthielt 15 mg/ml Quso.

2.3.4 Nüchternblut-Entnahme beim Versuchstier und Menschen - Basales Plasma-Sekretin

Zunächst wurde ein Teil Trasylol mit drei Teilen Aqua bidest. verdünnt. 45 ml verdünntes Trasylol und 5 ml EDTA-Lösung (5.4 g/50 ml Aqua bidest.) wurden warm unter Rühren in Lösung gebracht. Dieses Gemisch hemmt Proteasen (Trasylol) bzw. schafft Plasma, frei von biologisch aktiven Calciumionen. 9 ml[1] Frischblut (Mensch, Versuchstier) wurden unmittelbar zu 1 ml[1] Trasylol-EDTA-Lösung in einer eisgekühlten Röhre gegeben. Anschließend wurden die Röhren bei 4 °C und 3 000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert, das Plasma aliquotiert und bei -20 °C in Eppendorf-Röhren gelagert.

Die Sekretin-Untersuchungen beim Menschen wurden an 31 gesunden Probanden beiderlei Geschlechts (♂ 16, ♀ 15, Alter 19-76 Jahren), durchgeführt. Während der Untersuchung waren alle auf ihrer freien häuslichen Diät, hielten aber vor der Untersuchung eine 12 - 15-stündige Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz ein. Die Versuchstiere wurden 24 h nüchtern gesetzt.
Das Blut wurde beim Hund (Beagle; männlich, 1 - 1 1/2 Jahre alt) und beim gesunden Menschen aus der Armvene, beim Kaninchen (männlicher Labor-Stamm) aus der Ohrvene mit einer Venofix-Braunüle entnommen. Die Ratte (männliche Sprague-Dawley, ca. 250 g Gewicht) wurde zur Blutgewinnung mit Nembutal® (6 mg/100g Körpergewicht intraperitoneal) narkotisiert. Die Entnahme erfolgte mittels Rekordspritze entweder aus der Aorta oder der Pfortader.

2.3.5 Intraduodenale Infusion von HCl oder NaCl zum Studium der Änderung von Plasma-Sekretin bei der Ratte

Die Ratten wurden narkotisiert (s. oben) und auf einer wärmenden Unterlage, die auf konstant 37 °C gehalten wurde, gelagert. 0.5 - 1 cm distal von Pylorus wurde ein PVC-Schlauch (ca. 1 mm ⌀) ca. 1 cm in distaler Richtung ins Duodenum geschoben. Die Infusion

[1] oder kleinere Aliquote dieser Materialien

erfolgte mit einem Perfusor. Während 20 Minuten wurde jeweils 5 Ratten 1 ml 0.1 M HCl bzw. 1 ml 0.1 M Salzlösung verabreicht. Sofort anschließemd wurde Blut aus der Aorta und der Pfortader genommen.

2.3.6 Verabreichung einer Testmahlzeit beim Hund zum Studium des Verhaltens von post-prandialem Plasma-Sekretin

Untersucht wurden intakte Tiere (n= 6) und solche mit vollständiger Atrophie des exokrinen Panreas-Parenchyms in Folge vorausgegangener Okklusion des Pankreasganges mittels alkoholischen Prolamin (n = 5), (32). Dieses Protokoll erschien sinnvoll, um einen unterschiedlichen intraduodenalen Säuregrad zu erreichen (in Folge verminderter Sekretion von Bikarbonat), und konsekutiv unterschiedliche Freisetzung von Sekretin aus der Duodenal-Mucosa. Beagle-Hunden wurde mittels einer Duodenalsonde die Testmahlzeit, bestehend aus 5 g Chappi pro kg Körpergewicht, gelöst in Aqua-bidest, in den Magen verabreicht. Die Blutentnahme erfolgte (s. oben) 30 und 10 Minuten vor, sowie 15, 30, 60, 120, und 180 Minuten nach Verabreichung der Probekost.

2.3.7 Einnahme einer synthetischen Probekost zum Studium von postprandialem Plasma-Sekretin beim Menschen

Nüchternen Versuchspersonen (s. oben) wurde Blut für den Leerwert (Probe-O) entnommen. Anschließend erhielten sie 600 ml Kamillentee (aufgebrüht in Aqua bidest), um die Sekretin-Freisetzung nach alleiniger Verabreichung von neutraler Flüssigkeit in den Magen zu untersuchen (Kontroll-Periode), 2 Stunden nach dieser Periode wurde eine Testmahlzeit (Vivasorb) eingenommen. Blut wurde nach einer Stunde (Probe-B) und nach 2 Stunden entnommen.

2.3.8 Verdünnbarkeit von postprandialem Humanplasma und Haltbarkeit nach Lagerung bei 4 ^{o} C

Die Prüfung auf Verdünnbarkeit (= faktorielle Wiederfindung)

ist als ein Maß für die Meßbarkeit von "wahrem" Peptidhormon akzeptiert, ist aber nicht absolut aussagefähig (auch Faktoren welche unspezifische Interferenz herbeiführen, können ideal verdünnbar sein). Wir haben postprandiales Humanplasma gepoolt und die Verdünnungsstufen 1 + 1, 1 + 3, 1 + 7, 1 + 11, (Teile Plasma + Teile Assay-Diluent) studiert.
In einer weiteren Serie wurde dieses Pool-Plasma auf Haltbarkeit der Sekretin-Immunoreaktivität nach längerem Stehen bei 4 ^{o} C untersucht.

2.3.9 Engere Charakterisierung der Immunoreaktivität im Plasma mittels Gel-Chromatograhpie

Diese Untersuchungsserie schien angezeigt, da Quso als Adsorbens für Peptidhormone allgemeine Verbreitung finden konnte, und wir die relativ hohe "unspezifische" Plasma-Immunoreaktivität nicht ausreichend interpretieren konnten. Verwendet wurde ein Pool aus Nüchtern-Plasma von Beagle-Hunden (n = 16). Die einzelnen Schritte: auf einer Säule von Sephadex G 50 sf (15 x 250 mm) wurde Tracer-Sekretin mittels 0.15 M Natriumacetat, pH 5.0 (2.7 g HSA/L, 0.5 Millionen KIE Trasylol/L) eluiert, und die Säule zusätzlich mittels markiertem bovinem Parathormon (b-PTH 1-84), Tracer-Insulin (human), Dextran-Blau, ^{125}J-Na geeicht.
Die Prozedur wurde für Tracer-Sekretin und seine Elution mit 6 M Harnstoff wiederholt, um die Elutionsposition von Sekretin unzweideutig festzulegen. (s. unten: nicht-kovalente Bindungen).
Auf der gleichen Säule wurden sowohl 1.5 ml Plasma als auch, in einer unabhängigen Elution 1.5 ml Quso-Plasma chromatographiert, und die Eluate auf Sekretin-Immunoreaktivität mittels Radioimmunoassay untersucht. Unter identischen Bedingungen wurde Sekretin mittels Radioimmunoassay in den Eluaten nach vorheriger Auftragung von ca. 10 ng synthetisches Sekretin gemessen. Zum Ausschluß nicht-kovalenter Bindung von Plasma-Sekretin an Makromoleküle im Plasma bzw. an Humanalbumin des Elutionsmittels (s. oben) wurden 6 ml Pool-Plasma lyophilisiert, in 1,5 ml Assay-Diluent rekonstituiert, auf die Säule gebracht, mit zusätzlich 6 M Harnstoff eluiert und mittels Radioimmunoassay untersucht.

2.3.10 Präsentationen der Daten und Statistik

Im allgemeinen werden Ergebnisse als Median und Bereich der Einzelwerte, sowie zugehörige Interdezilbereiche angegeben, soweit nicht anders beschrieben. Da Nicht-Gauß-Verteilungen vorherrschen, wurde als Verfahren für die Prüfung auf Signifikanz beobachteter Unterschiede der nichtparametrische U-Test eingesetzt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Nötige Einzelschritte beim Aufbau der radioimmunologischen Bestimmung (RIA) von Sekretin

3.1.1 Produktion von Antiseren durch Koppelung von Sekretin an Proteine sowie Bestimmung des Titers

3.1.1.1 Koppelung von Sekretin an Thyreoglobulin und an das Serumalbumin vom Rind

Es gelang, 38 % des eingesetzten Tracer-Sekretins an das Thyreoglobulin und 45 % des eingesetzten Tracer-Sekretins an das Serumalbumin zu koppeln. Auf dieser Basis wurde eine vergleichbare Koppelungs-Rate für (sog. "kaltes") Sekretin angenommen.

3.1.1.2 Bestimmung des Titers von Seren

Die Titerentwicklung in den Immunisierungsgruppen: 1. Thyreoglobulin-Konjugation (Antigen, gelagert ca. 5 Jahre, bei -20 ° C); 2. unkonjugiertes Sekretin; 3. Thyroglobulin - Konjugation (lyophilisiertes Antigen); 4. BSA-Konjugation sind in Tab. 2 und Abb. 1 dargestellt.

Tab. 2: Die angegebenen Verhältniszahlen geben den Grad der Serum-Verdünnung an, bei welcher 50 % des eingesetzten Tracers vom jeweiligen Antiserum gebunden werden.

Boosterung	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
1	/	1 : 200	/	1 : 190
2	/	1 : 1 150	1 : 380	1 : 4 600
3	1 : 120	1 : 3 500	1 : 10 500	1 : 6 500
4	1 : 1 400	1 : 27 000	1 : 21 000	1 : 12 000
5	1 : 4 000	1 : 73 000	1 : 73 000	1 : 5 100
6	/	1 : 21 000	1 : 36 000	/
7	1 : 2 300	1 : 7 200	1 : 26 000	/
8	1 : 1 900	/	/	/
9	1 : 1 600	/	/	/
10	1 : 3 000	/	/	/

Der höchste Titer (s. Abb. 1) wurde bei den verschiedenen Immunisierungsgruppen nach der 4. Boosterung (Immunisierungsgruppe 4) bzw. nach der 5. Boosterung (Immunisierungsgruppe 1 - 3) erreicht.

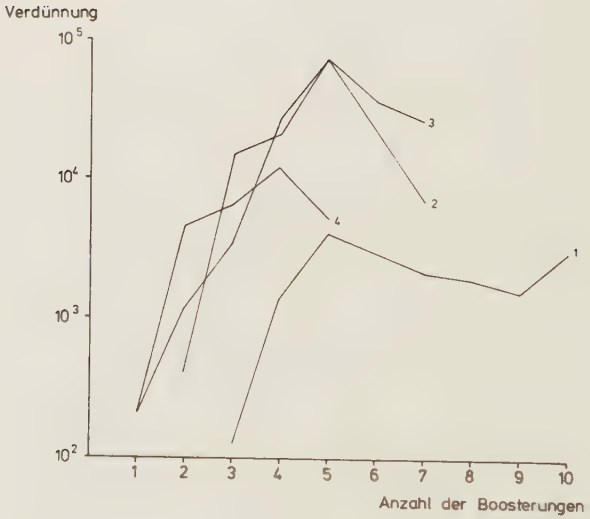

Abb. 1 : Titerentwicklung nach unterschiedlicher Immunisierung: 1. Sekretin-Thyreoglobulin-Konjugation (Antigen gelagert ca. 5 Jahre bei -20 ° C); 2. unkonjugiertes Sekretin; 3. Sekretin-Thyreoglobulin-Konjugation (lyophilisiertes Antigen); 4. Sekretin-BSA-Konjugation (s. Absatz "Immunisierung von Kaninchen", Seite 9)

Die Abb. 2 und Tab. 3 zeigen die Titerentwicklung des Serums von Kaninchen 1 der Immunisierungsgruppe 3 (Sekretin-Thyreo - globulin-Konjugation). Für den RIA verwendeten wir das Serum der 5. Boosterung mit dem Titer 1 : 73 000. Er bindet in der Endverdünnung von ca. 630 000 im Sekretin-RIA noch ca. 23 Prozent Tracer in Abwesenheit von Standard-Sekretin.

Tab. 3: Entwicklung der Antikörperproduktion bei Kaninchen 1 aus der Immunisierungsgruppe 3 (Sekretin-Thyreoglobulin-Konjugation)
Angegeben sind die Verdünnungsstufen des jeweils 14 Tage nach der letzten Booster-Impfung gewonnenen Serums (links), sowie die erreichte Bindung (Bo) = 100 $\times$ $\frac{\text{(cpm Antikörpergebunden (O) - cpm unspezifischgebunden (TK)}}{\text{cpm Tracer (T)}}$ %

Serumverdünnung	Boosterung Nr.						
	1	2	3	4	5	6	7
1 : 36	25	60	71	64	70	73	74
1 : 72	17	56	69	64	67	71	70
1 : 144	16	53	66	62	65	68	68
1 : 288	14	/	62	62	62	66	66
1 : 576	11	48	61	57	60	64	63
1 : 1 152	9	47	58	56	59	61	60
1 : 2 303		41	53	54	57	59	58
1 : 4 608		33	53	50	57	58	55
1 : 9 216		28	51	52	57	56	53
1 : 18 432		23	47	51	54	54	52
1 : 36 864		18	40	47	53	50	48
1 : 73 728		15	33	38	50	44	41
1 : 147 456		11	29	28	43	32	30
1 : 294 912			20	23	32	23	23
1 : 589 824			16	18	25	17	20
1 : 1 179 648			14	13	20	14	14

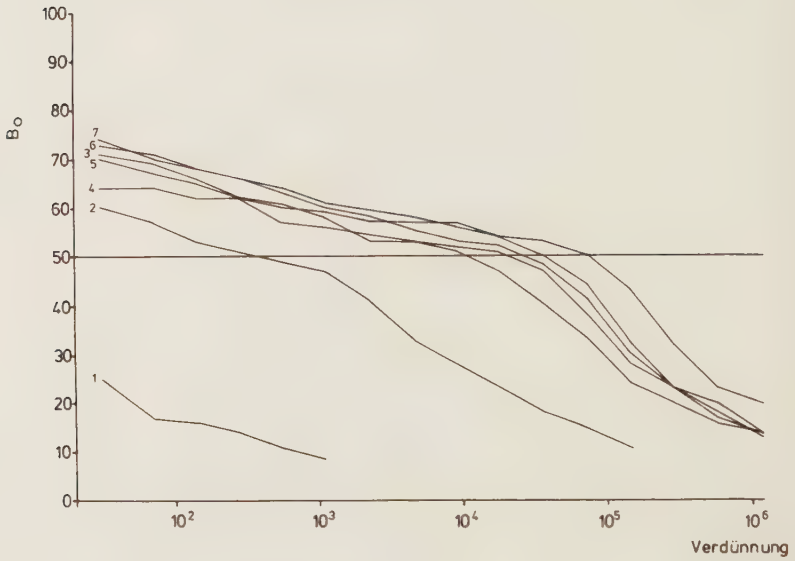

Abb. 2: Entwicklung der Titerkurve von Kaninchen 1 der Immunisierungsgruppe 3 (Sekretin-Thyreoglobulin-Konjugation; siehe Absatz "Immunisierung von Kaninchen", Seite 9. Die Ziffern 1-7 entsprechen der Anzahl der Boosterungen bzw. der darauf folgenden Blutentnahme (siehe Absatz "Gewinnung von Seren", Seite 10)

3.1.2 Reinigung von markiertem Sekretin, Ausbeute, spezifische Aktivität und Lagerung des Tracers

3.1.2.1 Reinigung auf Sephadex G 50

Wir erhalten, wie es aus der Tab. 4 und Abb. 3 ersichtlich ist, drei Elutionsgipfel (die Prozentzahlen beziehen sich auf die in die Reaktion eingebrachte Radioaktivität = 100 Prozent). Der erste Gipfel entspricht wahrscheinlich markiertem, aber an Serumalbumin gebundenem Sekretin, oder einem Anteil von nicht-kovalent an Serumalbumin gebundenem ^{125}J-Na der zweite dem in das Sekretin inkorporierten ^{125}J-Na, der dritte dem freien ^{125}J-Na (= sog. Salz-Peak).

Tab. 4: Reinigung auf Sephadex G 50[1] von Sekretin markiert nach verschiedenen Varianten

	Gipfel		
	I	II	III
a) ^{125}J-Na (Behring) Sekretin (synthetisch 5 µg)	11 %	56 %	33 %
b) ^{125}J-Na (NEN) Sekretin (synthetisch 5 µg)	3 %	10 %	87 %
c) ^{125}J-Na (NEN) Sekretin (DATA) 5 µg)	1 %	99 %	0 %

[1] Einzelheiten, s. Absatz "Reinigung von markiertem Sekretin", Seite 13

Wir fanden, daß ^{125}J-Na von unterschiedlichen Lieferfirmen von synthetischem Sekretin unterschiedlich inkorporiert wird (Behring versus New England Nuclear). Die Gründe sind unklar. Die Tracer-Ausbeute in Gipfel II war einmal 56 %, einmal 10 %. Außerdem wurde ^{125}J-Na der Firma New England Nuclear, in synthetischem Sekretin zu 10 %, in DATA-Sekretin zu 99 % eingebaut. Die bessere Markierungs-Ausbeute von diesem Sekretin-Analog, verglichen mit nativem Sekretin, ist bekannt (33).

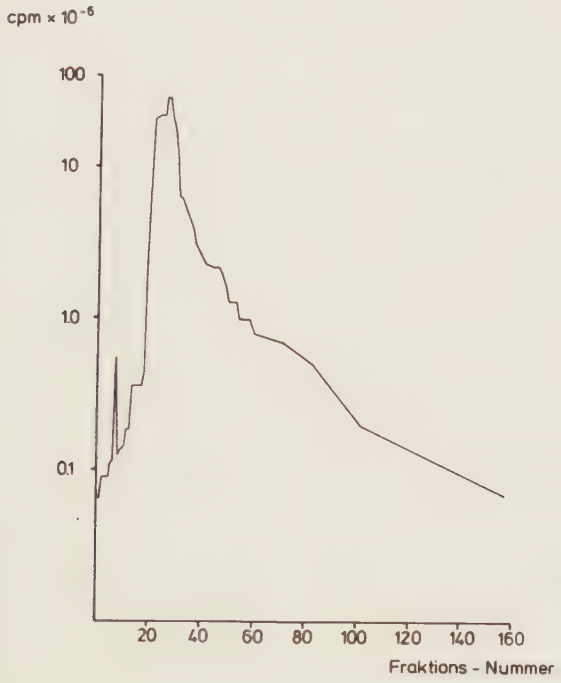

Abb. 3: Reinigung von markiertem Sekretin auf Sephadex G 50 superfine (9 x 550 mm; 0.25 Ammoniumhydrogenkarbonat, pH 8.0; 2.5 µM Serumalbumin vom Rind), der Markierungsvariante b) (siehe Absatz "Markierung von Sekretin" Seite 11; Absatz "Reinigung von markiertem Sekretin", Seite 13).

3.1.2.2 Reinigung auf SP-Sephadex C-25

Wir erhalten, wie aus Tab. 5 und Abb. 4 ersichtlich, drei Elutionsgipfel. Der erste entspricht dem freien ^{125}J-Na-Salz. Der zweite ist als Vorgipfel zum dritten zu betrachten, weil diese Kombination nicht immer auftritt. Der dritte Gipfel entspricht Sekretin, in welches ^{125}J-Na inkorporiert wurde.

Tab. 5: Reinigung auf SP Sephadex C-25[1] von Sekretin markiert nach verschiedenen Varianten

	Gipfel		
Markierungs-Variante	I	II	III
a ^{125}J-Na(Behring) Sekretin (synthetisch 5/ug)	73 %	/	27 %
c ^{125}J-Na(NEN) Sekretin (DATA 5/ug)	8 %	/	92 %
d ^{125}J-Na(NEN) Sekretin (DATA 2/ug)	7 %	3 %	90 %
e ^{125}J-Na(NEN) Sekretin (DATA 1/ug)	2 %	1 %	97 %
f ^{125}J-Na (Behring) Sekretin (DATA 1/ug)	83 %	5 %	12 %

Diese Chromatographie zeigt, daß ^{125}J-Na von unterschiedlichen Lieferfirmen eine unterschiedliche Inkorporationsrate nicht nur in synthetischem Sekretin sondern auch in

1) Einzelheiten, s. Absatz "Reinigung von markiertem Sekretin", Seite 13

DATA-Sekretin bewirkt. Der Unterschied in der Markierungs-Ausbeute muß also mit der Präparation des radioaktiven Salzes, nicht mit strukturellen Unterschieden des Peptids, zusammenhängen. Weiterhin wurde festgestellt, daß sich trotz Verringerung der Masse von DATA-Sekretin pro Markierung (5 µg, 2 µg oder 1 µg) die Tracer-Ausbeute in Gipfel III um 90 % bewegt.

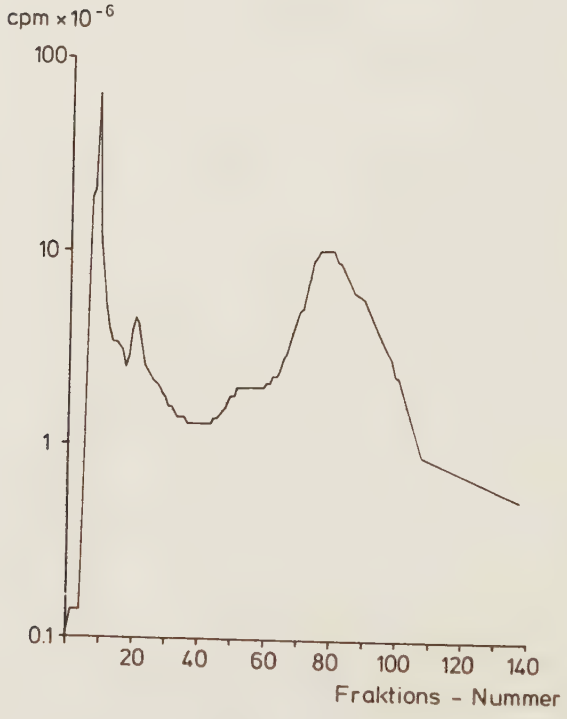

Abb. 4: Reinigung von markiertem Sekretin auf SP Sephadex C-25 (9 x 280 mm; 0.15 Natriumacetat pH 5.0, 45 µM humanes Serumabumin, 0.5 Millionen KIU Trasylol), der Markierungsvariante e) (siehe Absatz "Markierung von Sekretin", Seite 11; Absatz "Reinigung von markiertem Sekretin", Seite 13).

3.1.2.3 Ausbeute und spezifische Radioaktivität

Bei n = 11 Markierungen der Variante e in Tab. 1, Seite 12 [1 mCi ^{125}J-Na (NEN); 1 µg DATA-Sekretin; Reinigung auf Sp Sephadex C 25] wurde eine mittlere Ausbeute von 73.9 % (SD 15.8, SEM 4,75) erzielt. Die mittlere spezifische Radioaktivität betrug 739 µCi/µg.

3.1.2.4 Lagerung und Weiterverarbeitung des markierten Sekretins

Der im Elutionsmittel bei -20 ° C (im gleichen Volumen Anion-Exchange-Resin) gelagerte Tracer des Absatzes e (Tab. 1), kann mindestens 6 Wochen im RIA verwendet werden, ohne daß seine Bindungsfähigkeit an den Antikörper abnimmt (Punkt 1 der Standardkurve) bzw. die unspezifische Bindung von Tracer in der Standard- oder Probenröhre (Röhre C) zunimmt. (Einzelheiten siehe Absätze "Markierung von Sekretin", Seite 11, "Reinigung von markiertem Sekretin", Seite 13; und Reproduzierbarkeit der Standardkurve", Seite 19).

3.1.3 Die Schädigung von markiertem Sekretin
(= Qualitätsprüfung des Tracers).

3.1.3.1 Bewertung auf der Basis des sog. "jodination damage"

3.1.3.1.1 Durch Talk-Resin-Trichloressigsäure-Test

Tab. 6: Talk-Resin-Trichloressigsäure-Test verschiedener Varianten von markiertem Sekretin, gereinigt auf Sephadex G 50[1)]

		a ^{125}J-Na Behring Sekretin 5/ug synthetisch	b ^{125}J-Na NEN Sekretin 5/ug synthetisch	c ^{125}J-Na NEN Sekretin 5/ug DATA
		n = 1	n = 1	n = 1
Gipfel I	Talk	19	18	/
	Resin	43	64	/
	TCA	82	64	/
Gipfel II	Talk	76	66	90
	Resin	32	13	30
	TCA	75	66	93
Gipfel III	Talk	14	12	/
	Resin	78	90	/
	TCA	16	10	/

Aufgrund des Ergebnisses in Tab. 6 (Zahlen bedeuten Prozent von gesamter Radioaktivität = 100; Einzelheiten s. Absatz "Markierung von Sekretin", Seite 11) erscheint der Gipfel II (Sekretin-Tracer) der Markierung von DATA-Sekretin als der mit dem größten Anteil von Hormon, d. h. dieser Gipfel ist auch identisch mit dem größten Anteil an markiertem Sekretin (gebunden an Talk).

[1)] Einzelheiten, s. Absatz Das sog. "jodination-damage", Seite 14

Tab. 7: Talk-Resin-Trichloressigsäure-Test verschiedener Varianten von markiertem Sekretin, gereinigt auf SP Sephadex C-25[1)]

	a	b	c	d
	^{125}J-Na Behring Sekretin 5/µg (synthetisch)	^{125}J-Na NEN Sekretin 5/µg (DATA)	^{125}J-Na NEN Sekretin 2/µg (DATA)	^{125}J-Na NEN Sekretin 1/µg (DATA)
	n = 1	n = 4	n = 5	n = 4
Gipfel I Talk	13	15	20	19
Resin	100	90	87	92
TCA	23	12	15	18
Gipfel II Talk	/	/	78	77
Resin	/	/	31	24
TCA	/	/	64	77
Gipfel III Talk	80	90	91	94
Resin	29	12	17	17
TCA	84	96	93	94

Aufgrund der Definition des Tests[1)] erscheint der Gipfel III des Tracer-Sekretins in den Markierungen von DATA-Sekretin als jener mit dem größten Anteil von Hormon (Zahlen bedeuten Prozent von gesamter Radioaktivität = 100). Der Gipfel II, den wir als Vorgipfel zu Gipfel III betrachten, enthält weniger Hormon.

3.1.3.1.2 Durch Prüfung der Bindung von Tracer an Exzeß-Antikörper-Konzentration

Der Tracer der Markierungs-Variante e (1 mCi ^{125}j-Na, 1/µg DATA-Sekretin; Reinigung auf SP Sephadex C 25; Einzelheiten s. Absatz "Markierung von Sekretin", Seite 11) erbrachte mit dem Serum des Kaninchen 1 der Immunisierungsgruppe 3, Sekretin Thyreoglobulin-Konjugation, 5. Boosterung, Titer 1 : 73 000,

[1)] Einzelheiten s. Absatz Das sog. "jodination-damage" Seite 14

eine Bo 92,5 %, eine unspezifische Bindung von 3 %, jedoch nur eine Bindung von 1 % in der Kontrollröhre (TK).

3.1.3.2 Bewertung auf der Basis des sog. "incubation-damage" (Elektrophorese)

Wie aus Tab. 8 ersichtlich, ist nach Trypsin-Behandlung nur noch eine geringe Radioaktivität am Auftragungsort nachweisbar. Im Gegensatz dazu verbleibt der Großteil der Radioaktivität dann am Auftragsort, wenn kein Trypsin zugesetzt war.

Tab. 8: Das "incubation-damage" und Trypsinverdauung von markiertem Sekretin in verschiedenen Medien (mittels Elektrophorese[1])

	Inkubation 24 h		Inkubation 48 h	
Laufzeit der Elektrophorese	30 min	60 min	30 min	60 min
Trasylol EDTA Plasma	91	92	92	86
Plasma; Quso-behandelt	90	87	100	91
Seretin; Quso-behandelt	85	86	84	87
Trypsin-Verdauung in Tracer-Sekretin; pH 4	2	5	3	4
Trypsin-Verdauung in Tracer-Sekretin; pH 8,0	2	2	6	7

Die Zahlen geben den Prozentsatz der am Auftragsort verbliebenen Radioaktivität von Tracer-Sekretin an.

[1] Einzelheiten, s. Absatz "Das incubation-damage", Seite 15

3.1.4 Optimierung der Bedingungen für den Radioimmunoassay von Sekretin

3.1.4.1 Antikörper und Affinität zwischen Antikörper und Sekretin

Wir erstellten die Affinitätskonstante (Ko) aus dem Mittel von 16 Standardkurven (s. Absatz " Reproduzierbarkeit der Standardkurve", Seite 19.), das Verfahren wurde nach Scatchard (29) durchgeführt.
Nach der Gleichung Y = +0.2945 - 0.2144X ermittelten wir die Affinitätskonstante (Ko) mit 2.144×10^{-11}LM, sie entspricht der Steigung der Geraden a) in Abb. 5, in der das Verhältnis von gebundenem zu ungebundenem Sekretin gegen das gebundene in fM aufgetragen ist. Die Steigung der Geraden b) entspricht der Affinitätskonstante (Ko) von 2.78×10^{-10}L/M ihre Gleichung ist Y = + 0.0935 - 0.0278 X. Diese zweite Gerade b) läßt auf eine zusätzliche Antikörperpopulation mit allerdings geringer Affinität zum Antigen schließen.

3.1.4.2 Wahl der Tracer-Dosis für den Assay

Wie Tab. 9 zeigt, liegt unsere Tracer-Dosis bei ca. 4 500 cpm pro Röhre, weil mit dieser Dosis die Bindung (Bo) an den Antikörper in Abwesenheit von unmarkiertem Sekretin am größten, die Bindung an Kohle-Trennmedium (TK) am kleinsten ist.

Tab. 9: Einfluß der Tracer-Dosis auf die Bindung an den Antikörper bzw. Trennmedium.

Röhre					
T; cpm	2 200	4 500	9 000	18 000	36 000
TK; %	2.3	1.6	4.8	3.7	4.9
Bo; %	55.0	56.8	52.1	46.8	35.1

3.1.4.3 Einfluß unterschiedlicher Verdünnungsmittel auf die Verdünnungskurve durch Standard-Sekretin

Wir erreichten mit dem Assay-Diluent nach Tai und Chey et al. (13), pH 7.8, unter unseren Bedingungen zwar eine Bo zwischen 5 - 28 Prozent, konnten aber weder einen empfindlichen Kurvenverlauf noch ausreichende Reproduzierbarkeit beobachten.
Das Assay-Diluent nach Strauss und Yalow (30), pH 8.6, arbeitete in unserem System nicht, d. h. bereits die Bo war niedrig, eine Verdrängungskurve nicht erstellbar.

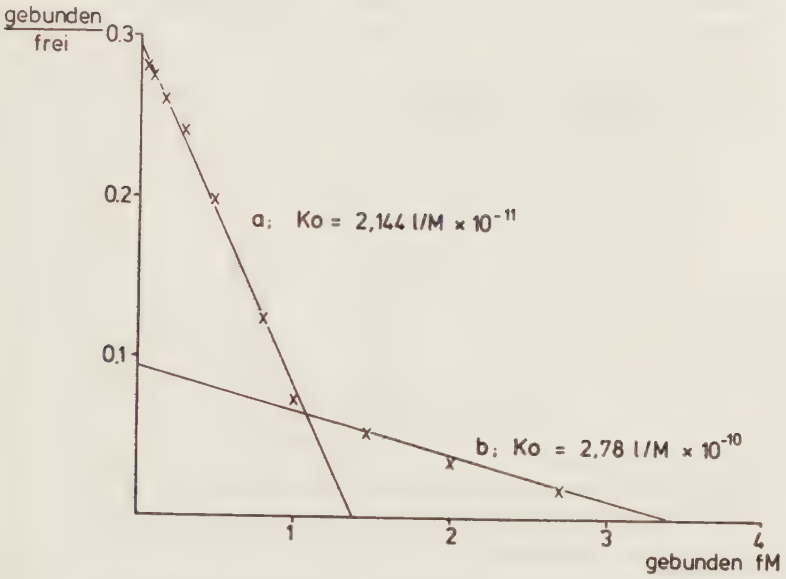

Abb. 5: Sog. Scatchard-plot zur Bestimmung der Affinitätskonstante (Ko) (siehe Absatz "Antikörper und Affinität zwischen Antikörper und Sekretin", Seite 16). Beachte, daß aufgrund der beiden unterschiedlichen Regressionsgeraden mit der Existenz von zwei differenten Populationen von Antikörpern im Antiserum K 1 (Immunisierungsgruppe 3; Sekretin-Thyreoglobulin-Konzentration, 5. Boosterung) zu rechnen ist.

Gleichungen der Regressionsgeraden: a) $Y = 0.2945 - 0.2144\ X$

b) $Y = 0.0935 - 0.0278\ X$

3.1.4.4 Abhängigkeit der Tracer-Bindung an den Antikörper (Bo) von der Inkubationszeit

Mit steigender Inkubationszeit wird die Bindung größer (Tab. 10). Ein weiterer Zuwachs an Bindung bei mehr als 24 h Inkubation war nicht zu beobachten, weshalb diese Inkubationsdauer beibehalten wurde.

Tab. 10: Einfluß der Inkubationszeit auf die Bindung von Tracer-Sekretin an den Antikörper

Stunden	Bo %
3	11.7
6	13.7
9	17.6
12	19.5
18	23.4
24	24.0

3.1.4.5 Abhänigkeit der errechneten Tracer-Bindung an den Antikörper vom Anteil der Kohle bzw. des Dextrans am Trennmedium

Aus der Bestimmung der Radioaktivität im Kohle-Pellet ergibt sich rechnerisch, daß bei stetig zunehmender Kohle bzw. Dextran die Bo abnimmt, die reine Phase des Tracer also zunehmen müßte (Tab. 11). Die Entscheidung, ob Antigen-Antikörper-Komplexe gesprengt (= Zunahme der freien Tracer-Phase), oder ob komplette Antigen-Antikörper-Aggregate von Kohle adsorbiert werden, konnte nicht weiter verfolgt werden (s. auch Diskussion). Für den Routine-Assay wurden 18 mg/ml Kohle und 1,8 mg/ml Dextran T-70 gewählt, weil mit dieser Kombination der Tracer pro Röhre (ca. 5 000 cpm) subtotal pelletiert wird (ca. 2 -3 % gehen an unspezifische Bindungsstellen von Substanzen des Assay-Diluent).

Tab. 11: Einfluß der Zusammensetzung des Trennmediums auf die "Bindung" von Tracer-Sekretin an den Antikörper

Kohle	Dextran	Bo
mg/ml	mg/ml	%
6	0.6	26.3
12	1.2	24.9
18	1.8	23.1
24	2.4	21.8
30	3.0	20.3
36	3.6	18.7
42	4.2	16.5
48	4.8	15.0
54	5.4	13.3
60	6.0	10.7

3.1.4.6 Optimierung der Inkubationszeit ohne und mit Zugabe von Tracer

Um eine ausreichend empfindliche Standardkurve, d. h. steilen Kurvenverlauf, reproduzierbar zu machen, mußte die Prä-Inkubation, d. h. die Inkubationszeit ohne Tracer, auf 72 h ausgedehnt werden. Die Tracerinkubation wurde bereits zuvor mit 24 h festgelegt (siehe dazu Abb. 6, Teil IV, 2).

3.1.4.7 Reproduzierbarkeit der Standardkurve

Die Zusammenfassung wiederholter Ansätze des Sekretin-RIA ist in Tab 12 dargestellt. Eine mittlere Standardkurve aus diesen Replikaten zeigt Abb. 9, Seite 56.

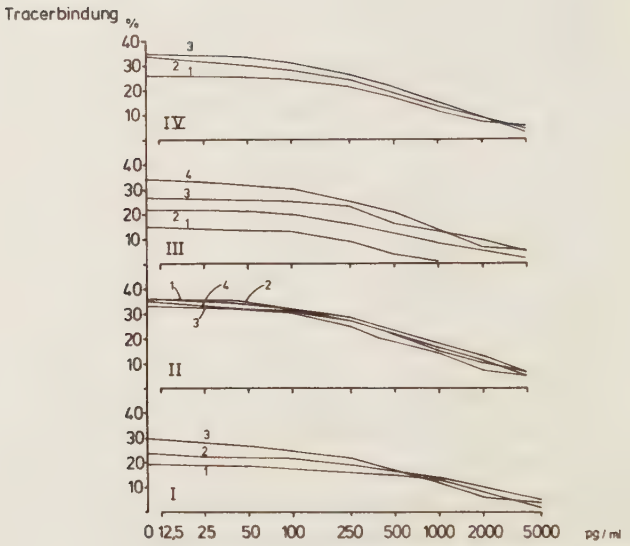

Abb. 6: Optimierung der Inkubationszeiten mittels des Studiums von sofortiger Tracerzugabe bzw. bei dessen zeitlich versetzter Zugabe (siehe Seite 19)
I. 0/24; 0/30; 0/48; II. 12/48; 36/48; 48/48; III. 48/18; 48/24; 48/30; 48/48; IV. 72/18; 72/24; 72/30; wobei die Zahl vor dem Querbalken die Inkubationszeit in Stunden, vom Ansatz bis zur Tracerzugabe; die Zahl nach dem Querbalken die Zeit von der Tracerzugabe bis zum Trennverfahren ist.

Tab. 12: Darstellung der mittleren ($\bar{x}$) Bindung (Bo der Standardpunkte 0-5000 pg/ml Sekretin und der Wirkung ansteigender Sekretin-Standardkonzentrationen auf die Tracer-Antikörperbindung, bezogen auf Bo = 100 Prozent $\boxed{(B/Bo)x100}$.
SD = Standardabweichung, SEM = mittlerer Fehler des Mittelwertes.

pg/ml	n	Bo	(B/Bo) x 100	1 SD[1)]	1 SEM[2)]
0	16	23.49	100.0	0.74	0.18
6.25	16	22.2	94,68	2,94	0.74
12.5	16	21.6	92.34	3.61	0.90
25.0	16	20.8	88.47	4.84	1.21
50.0	16	19.4	82.74	4.46	1.11
100.0	16	16.4	70.05	6.11	1.53
250.0	16	11.3	48.31	5.87	1.47
500.0	16	7.0	29.93	7.13	1.78
1000.0	16	5.1	21.73	6.96	1.74
2000.0	16	3.5	15.06	6.40	1.60
5000.0	16	1.9	7.93	6.38	1.60

Aus diesen 16 Ansätzen ergaben sich für die wichtigen Schnittpunkte der Tracer-Bindung bei 90, 75, 50, 25 Prozent mit der jeweiligen Standardkurve (= Intercepts 90, 75, 50, 25) die in Tab. 13 dagestellten Sekretin-Konzentrationen, das zugehörige Streuungsmaß (SD), sowie der daraus resultierende mittlere Variationskoeffizient (VK)[3)]

Tab. 13: Charakterisierung der 4 wichtigen Intercepts im Sekretin-RIA

(B/Bo x 100 Sekretin; pg/ml	SD	VK
90	18.0	4.0	22
75	70.6	5.50	8
50	230.0	5.70	2
25	760.0	6.88	1

1) Standardabweichung
2) mittlerer Fehler des Mittelwertes
3) Prozent von SD

3.1.4.8 Sensitivität der Standardkurve

Die Nachweisgrenze (= detection-limit) wurde nach folgender Gleichung gewonnen (die Werte wurden Tab. 12 entnommen):

$$100 - \frac{100 \times 2 \text{ SD (von Bo)}}{\text{Bo (Mittelwert aus 16 Stanardkurven)}} = 100 - \frac{100 \times 2 \times 0.74}{23.49}$$

$= 100 - 6.3 = 93.7$ (%) (B/Bo) x 100

Das "detection-limit" liegt deshalb bei ca. 7 pg/ml Standard-Sekretin.

3.1.5 Quantifizierung mittels Hemmkurve von Sekretin pro Tracer-Dosis

Die mit Tracer pro Röhre zugegebene Sekretinmasse wurde aus einer Selbsthemmkurve nach Morris (31) ermittelt, siehe Abb. 7, in der das Verhältnis von gebundener zur freien Radioaktivität [(B/Bo x 100)] gegen die Masse des Sekretin-Standards aufgetragen wurde (gestrichelte Linie = Mittel aus 16 Sekretin-Standard-Kurven). Die B/Bo x 100 wurde aus den steigenden Sekretin-Tracer-zugaben gegen jede einzelne Menge Sekretintracer in cpm gezeichnet (durchgehende Linie = Hemmkurve). Eine beliebige cpm-Menge kann gewählt werden, um durch graphische Interpolation die Masse Sekretin mittels der Standardkurve zu bestimmen, z.B. siehe gepunktete Linie Abb. 7, Beginn bei Punkt 50 000 cpm auf der X-Achse, senkrecht aufsteigend bis zum Schnittpunkt mit der Hemmkurve, dann horizontal verlaufend bis zum Schnittpunkt mit der Sekretin-Standardkurve, darauf senkrecht absteigend bis zum Schnittpunkt auf der Y-Achse im Punkt 450 pg. Folgende Werte wurden auf diese Weise der Abb. 7 entnommen (siehe Tab. 14) und in Abb. 8 eingetragen.

Tab. 14: Einzelwerte der Regressionsgeraden zur Bestimmung von Sekretin pro Tracer-Dosis (Einzelheiten s. Seite 50)

cpm	pg/ml
5 000	7
8 000	17
10 000	40
15 000	100
20 000	170
30 000	310
40 000	380
50 000	450
60 000	560

Die Regressionsgerade der eingetragenen Werte aus Tab. 14 (pg/ml-Y-Achse; cpm - X-Achse) gibt mit ihrem Schnittpunkt auf dem negativen Schenkel der Y-Achse die Masse von Sekretin in pg/ml an, d. h. pro Tracer-Dosis (ca. 5 000 cpm/100 µl) mit 4.7. pg, die Gleichung der Regressionsgerade ist $Y = + 0.0103 X - 47.6043$

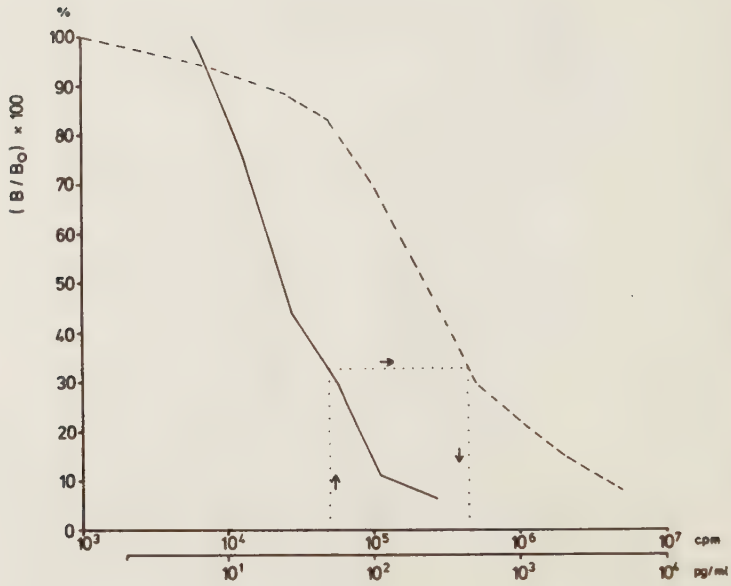

Abb. 7: Quantifizierung mittels Hemmkurve von Sekretin pro Tracer-Dosis.
(Einzelheiten siehe Seite 50).

(——————) Hemmkurve

(----------) Standardkurve, Mittelwert aus 16 einzelnen Standardkurven.

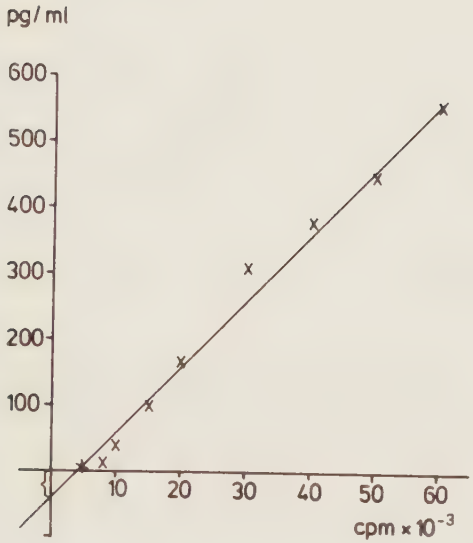

Abb. 8: Regressionsgerade zu Abb. 7 (s. Absatz "Quantifizierung mittels Hemmkurve von Sekretin pro Tracer-Dosis", Seiten 20 und 50).
Regressionsgleichung: Y = + 0.0103 x - 47.6043
Auf der Ordinate (negativer Schenkel) wird das sog. kalte Sekretin pro Einzeldosis-Tracer-Sekretin abgelesen [(4.7 pg Sekretin pro 100 µl (ca. 5000 cpm) Tracer].

3.1.6 Kreuzreaktion des Sekretin Radioimmunoassay mit anderen Hormonen

Für die Hormone Glukagon, Calcitonin, Gastrin, VIP, Motilin, GIP, Cholecystokinin-Octapeptid, Pankreatisches-Polypeptid, Wachstumshormon (Ratte), Parathormon, Caerulein, Ratten- und Human-Insulin, ergab sich keine Kreuzreaktion im physiologisch interessanten Konzentrationsbereich der Sekretin-Standardkurve und bis zu einer Zehnerpotenz darüber (ca. 10^5 pg/ml). Cholecystokinin-Pankreozymin zeigte ab ca. 10^3 pg/ml eine Kreuzreaktion, was wahrscheinlich auf ungenügende Präparation zurückzuführen ist (Abb. 9).

3.2 Basales Sekretin im Plasma

3.2.1 Die Adsorption von Tracer im Plasma an zugegebenes Quso

Mehr als 90 % des Sekretin-Tracers wurden regelmäßig durch Quso im Pellet gebunden. Man kann daraus schließen, daß die in Trasylol-EDTA-Plasma enthaltene Sekretin-Spezifische Immunoreaktivität durch Quso subtotal entfernt wird.

Tab. 15: Entfernung von Tracer-Sekretin aus Plasma durch Adsorption an Quso (zugesetzte Radioaktivität = 100 Prozent)

Plasma-probe	Überstand %	Pellet %
1	7.76	92.24
2	8.84	91.16
3	6.97	93.03
4	8.38	91.62
5	6.76	93.24
n =5		
x	7.74	92.26
SD	0.89	0.89
SEM	0.40	0.40

3.2.2. Prinzip der Bestimmung von Plasma-Sekretin durch Differenzberechnung

3.2.2.1 Wiederfindung von synthetischem Standard-Sekretin

Die Wiederfindung wird errechnet aus der Differenz der Meßwerte zwischen Sekretin-Immunoreaktivität im unbehandelten Plasma bzw. Quso-Plasma, und Plasma bzw. Quso-Plasma nach Zugabe von synthetischem Standard-Sekretin.
Bei Zugabe von 250 pg pro Röhre war die Wiederfindung im unbehandelten Plasma 237.8 pro Röhre (95.1 %), SD 63,80 pg (25.5 %), SEM 12.28 (n = 27). Bei gleicher Zugabe von Sekretin war die Wiederfindung im Quso-Plasma 228.5 pg (91.4 %), SD 60.05 (24.0 %), SEM 11.77 (n = 26).

3.2.2.2 Adsorption von synthetischen Standard-Sekretin an Quso

Es zeigte sich, daß 97.4 % (SD 2.84, SEM 1.16; n = 6) des wässrigen Sekretin-Standardmaterials von Quso adsorbiert wurden.

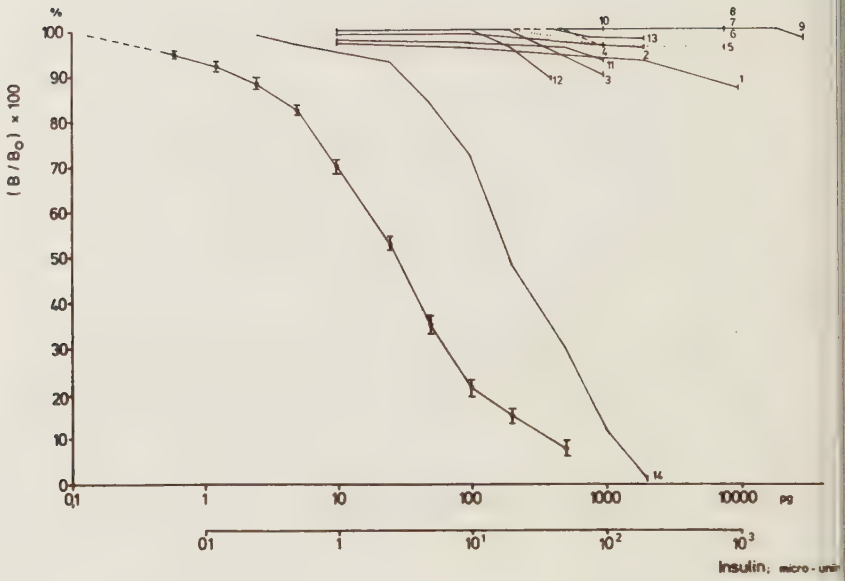

Abb. 9: Sekretin-Standardkurve (Mittelwerte ± 1 SEM n = 16 Einzelkurven) und Kreuzreaktion mit anderen Hormonen: 1. Glukagon; 2. Calcitonin; 3. Gastrin; 4. VIP; 5. GIP; 6. Cholecystokinin-Octapeptid; 7. Pankreatisches Polypeptid; 8. Motilin; 9. Wachstumshormon (Ratte); 10. Bovines Parathormon (1-84); 11. Caerulein; 12. Insulin (human); 13. Insulin (Ratte); 14. Cholecystokinin-Pankreozymin;
Einzelheiten siehe Absatz "Reproduzierbarkeit der Standardkurve", Seite 19; Absatz "Kreuzreaktionen des Sekretin-Radioimmunoassay mit anderen Hormonen", Seite 20.

3.2.2.3 Reproduzierbarkeit der Bestimmung von Sekretin im gepoolten humanen Plasma

Tab. 16: In Doppelproben von gepooltem Human-Plasma, welche Ansätze an 11 verschiedenen Tagen mitgegeben wurden, und in 9 Doppelproben, welche innerhalb eines Ansatzes gemessen wurden, fanden wir folgende Werte[1].

	11 Ansätze		1 Ansatz	
	Plasma	Plasma-Quso	Plasma	Plasma-Quso
n	11	11	9	9
$\bar{x}$	259	270	248	262
SD	61.7	60.6	32.1	30.8
SEM	18.6	18.2	10.7	10.8
VK; %	23.9	22.4	12.9	11.8
Median[2]	261	265	262	268
Bereich	163-373	157-361	202-293	196-296
ID-80[3]	164-307	213-307	216-287	248-293

Differenz (Plasma minus Plasma-Quso = pg/ml)		
n	11	9
$\bar{x}$	11	9.5
SD	13.7	15.4
SEM	4.1	5.1
Median	7	0
Bereich	0-36	0-43
ID-80	0-35	0-38
ID-60	0-18	0-14

[1] Einzelwerte siehe Anhang, Seite 84

[2] mittlerer Wert, wenn die Einzelwerte vom kleinsten zum größten ansteigend aufgelistet werden

[3] Interdezilbereich-80, entspricht jenem Bereich, welcher nach Abzug der niedrigsten und höchsten 10 % der Einzelwerte verbleibt.

3.2.3 Die Extraktionsverfahren

3.2.3.1 Effizienz der Ektraktion

In Prozent (Mittelwerte) des eingesetzten Tracers (cpm) fanden wir im Überstand:
bei der Methanol-Extraktion 60, SD 11, SEM 5
bei der Aceton-Extraktion 81, SD 3, SEM 1
bei der Äthanol-Extraktion 95, SD 8, SEM 3

3.2.3.2 Einfluß der Extraktion auf die Sekretin-Immunoreaktivität und die Wiederfindung von Standard-Sekretin im Extrakt:

Die Wiederfindungsrate errechnet sich aus der Differenz zwischen Sekretin, gemessen im extrahierten Plasma, und Sekretin, welches im Plasma nach vorheriger Zugabe von Standard-Sekretin (und nachfolgender Extraktion) gemessen wurde. Hier erreichten wir bei einer Zugabe von 250 pg pro Röhre eine mangelhafte Wiederfindung von 192 pg pro Röhre (76.8 %), SD 77, SEM 23.2 (n = 11).

Die Wiederfindungsrate nach der Rekonstitution des Extraktes errechnet sich aus der Differenz zwischen Sekretin im Extrakt und Sekretin gemessen im Extrakt nach Zugabe von Standard-Sekretin zu diesem. Hier erreichten wir bei Zugabe von 250 pg pro Röhre eine mäßig bessere Wiederfindung von 222 pg pro Röhre (88.8 %), SD 74, SEM 22.3 (n = 11).

3.2.3.3 Ermittlung unspezifischer Sekretin-Immunoreaktivität im Plasma-Extrakt

Durch Zugabe von Quso zum rekonstituierten Plasma-Extrakt zeigte sich,daß die meßbare Immunoreaktivität um 71.3 % (SD 28.7; SEM 9.56; n = 9) abfällt, d. h. daß trotz Extraktion noch 28.7 % (SD 28.7. SEM 9.56; n = 9) des ohne Quso-Behandlung aus dem Extrakt erstellten Meßwertes unspezifischer (Nicht-Sekretin-) Natur sind.

3.2.4 Basales Plasma-Sekretin verschiedener Spezies

3.2.4.1 Beim Menschen, mittels der Methode der Äthanol-Extraktion

Wir fanden beim gesunden nüchternen Menschen die in Tab 17 aufgelisteten Werte für Sekretin (pg/ml). Im Vergleich zu anderen Angaben in der Literatur mit erheblich niedrigeren Nüchternwerten (12, 13, 14, 17, 22) sind sie als hoch zu bezeichnen.

Tab. 17: Basales Plasma-Sekretin beim Menschen mittels der Methode der Äthanol-Extraktion[1)]

	pg/ml
n	14
Bereich	18-52
Median	31
ID-80	22-52

3.2.4.2 Bei Mensch, Hund, Ratte, Kaninchen, mittels der Methode der Differenzberechnung.

Unter Benutzung dieses Verfahrens fanden wir bei gesunden, nüchternen Menschen und Hunden, sowie bei gesunden, nüchternen, narkotisierten Ratten und Kaninchen im venösen, bei der Ratte auch im arteriellem Blut, die in Tab. 18 eingetragenen Werte für Sekretin (pg/ml).

Tab. 18: Basales Plasma-Sekretin mittels der Methode Differenzberechnung[1)]

	Mensch	Hund	Ratte		Kaninchen
	Vene[2)]	Vene[2)]	Aorta	Pfortader	Vene[2)]
n	31	16	15	15	23
Median	0	16	0	31	0
Bereich	0-158	0-60	0-25	0-98	0-510
ID-80	0-67	1-37	0-25	15-49	0-235

[1)] Einzelwerte s. Anhang, Seite 84

[2)] Über Vorbereitung bzw. Blutentnahme siehe Absatz "Nüchternblut-Entnahme beim Versuchstier und Menschen - Basales Plasma-Sekretin"; Seite 25.

3.2.5 Wirkung intraduodenaler HCl oder NaCl-Infusion auf Plasma-Sekretin bei der Ratte

Alle Plasmaproben wurden in einem Assay angesetzt und Plasma-Sekretin durch Differenzberechnung ermittelt. Nach intraduodenaler HCl- oder NaCl-Infusion wurden die in Tab. 19 aufgelisteten Werte in der Aorta (n = 5 Tiere) und in der Pfortader (n = 5 Tiere) beobachtet. Danach stimuliert HCl zwar Sekretin, aber ein Anstieg ist nur im Pfortader-Plasma, jedoch nicht in der arteriellen Peripherie nachweisbar.
Da Nicht-Normalverteilung der Einzelwerte wahrscheinlich ist, wurden die parametrischen und nicht-parametrischen Daten angegeben. Der Unterschied zwischen Sekretin in der Pfortader nach HCl gegenüber jenen nach NaCl ist signifikant ($p < 0.01$; U-Test)

Tab. 19: Plasma-Sekretin (pg/ml) nach intraduodenaler HCl- oder NaCl-Infusion in Pfortader und Aorta bei der Ratte

	HCl-Infusion		NaCl-Infusion	
	Pfortader	Aorta	Pfortader	Aorta
n	5	5	5	5
Median	116	0	56	0
Bereich	41-183	0-3	0-119	0-6
ID-80	44-172	0-0	27-79	0-0

3.2.6 Wirkung einer Probekost auf Plasma-Sekretin beim gesunden Hund und beim Hund mit okkludiertem Pankreasgang

Das Plasma-Sekretin wurde durch Differenzberechnung ermittelt[1)].
Als präprandialen Ausgangswert betrachteten wir den arithmetischen Mittelwert der Meßwerte 30 Minuten und 10 Minuten vor

[1)] Einzelwerte siehe Anhang, Seite 85

Eingabe der Probekost. Abb. 10 A, B, C, zeigt den unterschiedlichen Anstieg von postprandialem Plasma-Sekretin. Die Gruppe A mit okkludiertem Pankreasgang weist bis 1 h nach Eingabe der Probekost stetig ansteigendes Sekretin auf. Nach 3 h hat Sekretin wieder den Ausgangswert vor Einnahme der Probekost erreicht. Die Gruppe B (Kontrollgruppe) zeigt bei 15 Minuten postprandial einen signifikanten Sekretin-Anstieg. Bei 30 Minuten ist Sekretin leicht abgefallen, bei 60 Minuten wiederum erhöht. Nach 3 h ist es zum präprandialen Ausgangswert zurückgekehrt. Die Abb. 10 C veranschaulicht das Plasma-Sekretin, wenn beide Tiergruppen zusammen betrachtet werden.

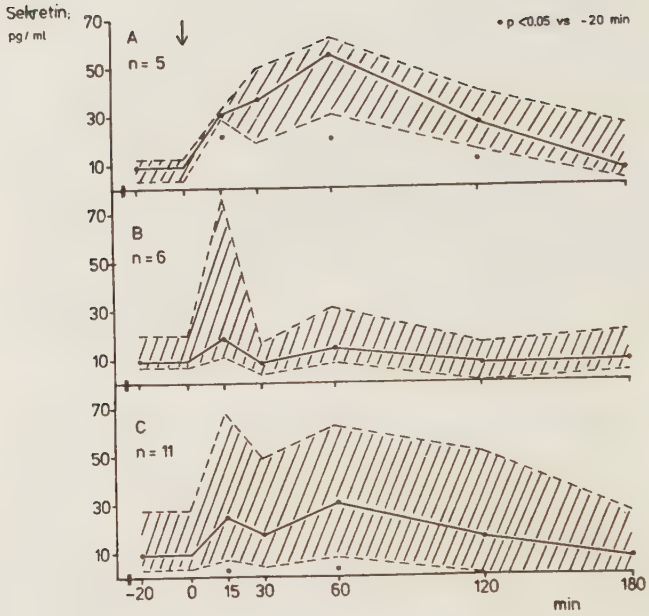

Abb. 10: Wirkung einer Testmahlzeit ( ) auf Plasma-Sekretin beim Hund (Beagle); A: Pankreasgang okkludiert; B: Pankreasgang offen; C: A + B Median und ID-80 $p \leq 0.05$ vs - 20 min
Einzelheiten siehe Seite 60 .

3.2.7 Wirkung einer Testmahlzeit auf Plasma-Sekretin beim gesunden nüchternen Menschen

Die Werte für Plasma-Sekretin wurden durch Differenzberechnung ermittelt, siehe dazu Tab. 20

Tab. 20: Plasma-Sekretin beim gesunden Menschen vor (A), 1 Stunde (B), und 3 Stunden (C) nach Einnahme einer synthetischen, vollbilanzierten flüssigen Probekost (Einzelheiten siehe Seite 26).[1] Das Plasma der Probe B einzelner Studienteilnehmer, welches die höchste mediane Sekretin-Immunoreaktivität enthält, wurde zusätzlich in den Verdünnungsstufen 1 + 1, 1 + 2, 1 + 3 Teile (Plasma + Diluent) gemessen. Die mittleren Meßwerte ergeben Kurvenverläufe parallel zur Standardkurve (Einzelheiten nicht dargestellt).

	0[2]	A[3]	B	C
n	31	8	8	8
x	20	36	57	42
SD	39	44	38	48
SEM	7	15	14	17
Median	0	15	72 [a]	24 [a]
Bereich	0-158	0-102	0-92	0-113
ID-80	0-67	0-85	0-91	0-104
ID-60[4]	0-19	0-30	44-83	0-73

[a]: $p \leq 0.05$ gegenüber 0

[1] Einzelwerte s. Anhang, Seite 86

[2] aus n = 31 Beobachtungen im Nüchtern-Plasma gesunder Menschen

[3] nach vorausgegangener Stimulation der Diurese durch Trinken von ca. 600 ml Kamillentee in aqua bidest.

[4] Bereich der Einzelwerte nach Abzug von 20 Prozent der niedrigsten bzw. höchsten Werte (vergleichbar ca. 65 % der Einzelwerte, d.h. aus Streuung von $\pm$ 1 SD um den Mittelwert, Normalverteilung vorausgesetzt).

3.2.8 Verdünnbarkeit von postprandialem Humanplasma und Haltbarkeit nach Lagerung bei 4 ° C.

Folgende Ergebnisse wurden mittels Differenzberechnung erzielt. Postprandiales Humanplasma in den Verdünnungsstufen 1 + 1, 1 + 3, 1 + 7, 1 + 11, (Einzelheiten siehe "Methoden", Seite 26) ist ideal verdünnbar. Die Einzelwerte sind (pg/ml): unverdünnt 60, 1 + 1 29, 1 + 3 16, 1 + 7 6, 1 + 11 unmeßbar niedrig. Die 5 Punkte ergeben eine standardparallele Kurve. Durch längeres Stehen wird Plasma-Sekretin zerstört: die gleiche Poolprobe (s. oben) ergibt frisch aufgetaut 64 pg/ml nach 12, 24, 48, 72, 96 h abfallende Werte von 61, 52, 54, 7, 19 pg/ml. Dieses Ergebnis ist für die praktische Durchführung des Sekretin-RIA von großer Bedeutung und muß streng beachtet werden.

3.2.9 Engere Charakterisierung der Immunoreaktivität im Plasma mittels Gelchromatographie

Aus Abb. 11, A ist zu ersehen, daß Tracer-Sekretin auf der Sephadex G 50 Säule sf, mit 0.15 M Natriumacetat, pH 5.0 (2.7 g HSA/1; 0.5 Millionen KIE Trasylol/1) in einem ersten kleinen und einem zweiten größeren Gipfel eluiert. Bei der Elution des gleichen Tracers mit zusätzlich 6 M Harnstoff ist nur noch ein Gipfel nachweisbar. Wir schließen daraus, daß der erstere kleine Gipfel nichtkovalent an HSA gebundenes Tracer-Sekretin repräsentiert, und daß diese Bindungen durch Elution mit 6 M Harnstofflösung gesprengt werden, was allgemein akzeptiert ist (34). Abb. 11, B zeigt, daß Plasma, eluiert mit 0.15 M Natriumacetat pH 5.0, untersucht im RIA, Immunoreaktivität an einer Position liefert, welche einer Substanz mit einem MG $>$ 10 000 [MG von bovinem PTH (1-84) ca. 10 000] zukommen müßte. das MG dieser Substanz, obwohl augenscheinlich von der Größenordnung dessen von Dextran-Blau (2 000 000), ist nicht näher zu charakterisieren. Quso-Plasma untersucht wie oben, weist an der gleichen Position nur noch ca. 1/10 jener Immunoreaktivität von Plasma auf, deren Elutionsposition mit b-PTH (1-84) grob

korrespondiert. Überwiegende Teile der größer-molekularen Substanzen mit Sekretin-Immunoreaktivität ist also durch Quso-Behandlung des Plasma entfernt worden.

Aus Abb. 11, C ist ersichtlich, daß das gleiche Plasma wie in Teil B, eluiert mit zusätzlich 6 M Harnstoff und untersucht im RIA, zwar Immunoreaktivität (Gipfel 1, ca 46 % an höhermolekularer Position, d. h. vor b-PTH (1-84) ergibt, aber auch zwischen b-PTH (1.84) und Insulin (Gipfel 2, ca. 17 %), und an einer Position (Gipfel 3, ca. 27 %), welche in Teil B von synthetischem Sekretin eingenommen wird. Damit erscheint bewiesen, daß in Peak 1, Teil B monomeres Sekretin (MG 3 500) enthalten ist.
Der Gipfel 1 in Teil C entspricht wahrscheinlich einem höhermolekularen, nicht genauer definierbaren Sekretin-Präkursor, Gipfel 2 der Immunoreaktivität von sog. big-Sekretin (Dimer; MG ca 7000), Gipfel 3 der Immunoreaktivität von monomerem Sekretin (MG ca. 3500). Die Fläche 1, in Abb. 11, B, welche die Sekretin-Immunoreaktivität in 1.5 ml Pool-Plasma, eluiert mit 0.15 M Natriumacetat pH 5.0, dargestellt, entspricht 25.8% der Flächen-Summe, welche die Sekretin-Immunoreaktivität von 6 ml Pool-Plasma (lyophilisiert, rekonstituiert in 1,5 ml), eluiert mit zusätzlich 6 M Harnstoff, repräsentiert (Abb. 11, C). Dabei ist bereits berücksichtigt, daß 6 M Harnstoff per se mit der Immunoreaktivität des Sekretin-RIA strak interferiert und deshalb hohe Hintergrund-Immunoreaktivität abgezogen werden muß.

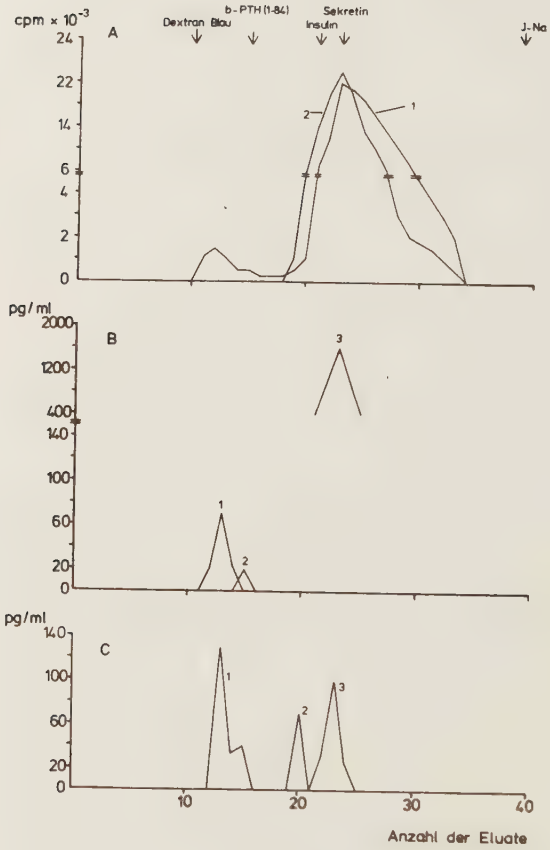
cpm x 10⁻³
A
Dextran Blau
b-PTH (1-84)
Sekretin
Insulin
J-Na
24
22
14
6
4
2
0
1
2
pg/ml
2000
1200
400
140
100
60
20
0
B
3
1
2
pg/ml
140
100
60
20
0
C
1
2
3
10
20
30
40
Anzahl der Eluate

Abb. 11

Abb. 11: Engere Charakterisierung der Immunoreaktivität im Plasma mittels Gel-Chromatographie (Einzelheiten siehe Text, Seiten 27 und 64).Mit (↓) sind die Elutions-Positionen von Säulen-Volumen (Vo), markiert mit Dextran-Blau, der ^{125}J-Tracer von bovinem Parathormon (1-84) (MG ca. 10 000), humenem Insulin (MG ca 6 000), porcinem synthetischen Sekretin (MG ca. 3 500) und des Markierungssalzes (^{125}J-Na) angegeben.

Teil A: Elutionsmuster von Tracer-Sekretin in 0.15 M Natriumacetat,pH 5.0 (1), bzw. mit zusätzlich 6.0 M Harnstoff (2).

Teil B: Elutionsmuster von Sekretin-Immunoreaktivität in Pool-Plasma (1.5 ml) (1), des gleichen Plasma nach Quso-Vorbehandlung (2), und von synthetischem immunoreaktiven Standard-Sekretin (3). Elutionsbedingungen wie im Teil A.

Teil C: Elutionsmuster von 6 ml lyophilisiertem Plasma, rekonstituiert mit 1,5 ml Assay-Diluent und eluiert mit zusätzlich 6.0 M Harnstoff.
Gipfel 1 korrespondiert grob mit dem Säulenvolumen (MG ca. 60 000).
Gipfel 2 entspricht ca MG 7000, Gipfel 3 mit synthetischem bzw. Tracer-Sekretin.

4 DISKUSSION

4.1. Kritik der Methoden

Der vorgestellte Sekretin-Radioimmunoassay erscheint zuverlässig und zum Studium der Physiologie und Pathophysiologie von Sekretin brauchbar.
Einige Aspekte verdienen Kommentare.

4.1.1 Immunisierung

Über die Gewinnung von Antiseren gegen Sekretin liegen zahlreiche Arbeiten vor. Einige berichten über hohe Titer (bis zu 1 : 1 008 000) (27) beim Kaninchen, wenn synthetisches Sekretin, konjugiert mit BSA, verwendet wurde (22, 27, 30, 33, 35). Ähnlich hohe Titer konnten wir mit dieser Methode beim Kaninchen nicht erreichen (s. Seite 29 und Abb. 1). Andere Arbeiten mit synthetischem Sekretin, konjugiert an Eialbumin, erbrachten auch erheblich niedrigere Titer (bis 1 : 15 000) beim Kaninchen (17, 36). Weiter wird berichtet, daß natürliches Sekretin, getragen von "microfine carbon particles" als Hapten einen Titer bis zu 1 : 60 000 beim Kaninchen erbrachte (16, 36).
In unseren Versuchen erzielten wir mit unkonjugiertem sytnetischem Sekretin, sowie mit synthetischem Sekretin, gekoppelt an Thyreoglobulin, Titer bis 1 : 73 000, Fahrenkrug et al. (27) fand in Bezug auf Titer und Affinität keinen Unterschied zwischen unkonjugiertem und an BSA konjugiertem Sekretin. Wir können festhalten, daß ein hoher Titer nicht unbedingt eine sehr hohe Affinität haben muß.
In Bezug auf die Affinitätskonstante wurde mit verschiedenen Sekretin-Präparationen vergleichbare Werte erzielt: Synthetisches Sekretin, konjugiert mit BSA, Ko: 3.5×10^{-11} L/M (22, 27), synthetisches Sekretin, konjugiert mit Eialbumin, Ko : 4×10^{-11} L/M (17). Wir fanden mit Thyreoglobulin-Konjugation von synthetischem Sekretin in dieser Arbeit eine Ko : 2.1×10^{-11} L/M, d. h. unser Assay verwendeter Antikörper von Kaninchen 1 (Thyreo-

globulin-Konjugation, Titer 1 : 73 000, 5. Boosterung) ist nur halb so affin wie jener in anderen hochempfindlichen Sekretin-RIA. Synthetisches Sekretin, gelagert über 5 Jahre bei -20 ^{o} C, anschließend gekoppelt an Thyreoglobulin, erbrachte im Vergleich zu lyophilisiert gelagertem Sekretin eine geringe Immunantwort. Der Verdacht ist berechtigt, daß Sekretin entweder noch tiefer gefroren gelagert werden muß, oder aber ein relativ unstabiles Peptid ist.
Wir fanden bei der Immunisierung sowohl mit unkonjugiertem, als auch mit synthetischem Sekretin, konjugiert mit Thyreoglobulin, einen vergleichbar hohen Titer, jedoch zeigte das Serum aus der Immunisierung mit unkonjugiertem Sekretin trotz weiterer Boosterungen einen raschen Abfall des Titers. Uns erscheint daher die Methode der Koppelung von synthetischem Sekretin mit Thyreoglobulin als brauchbar und zuverlässig für die Gewinnung von Sekretin-Antiseren.

4.1.2 Markierung von Sekretin

Nahezu alle Arbeiten zur Markierung von Sekretin (DATA-Analog, natürliches, synthetisches Sekretin) benutzen die Chloramin T-Methode (24, 25). Als einzige Alternative ist die Arbeit von Holahan et al. (37) zu nennen, welche Sekretin mittels Lactoperoxydase markierten. Mit dieser Methode haben wir keine Erfahrungen. Frühe Versuche, synthetisches Sekretin zu markieren, erzielten nur geringe spezifische Aktivitäten (70-100 $/\mu$Ci$/\mu$g), resultierend aus niedrigen Einbauraten von ^{125}J-Na in das Peptid (12, 38, 39). Später wurde von einer spezifischen Aktivität bis zu 350 $/\mu$Ci$/\mu$g berichtet (23). Allen diesen Arbeiten lag ein ziemlich hoher Anteil an synthetischem Sekretin (5 - 10 $/\mu$g pro Markierung), relativ zur eingesetzten Radioaktivität, zugrunde. Die Reinigung des markierten Hormons erfolgte mittels verschiedener Elutionsmittel über Gel-Chromatographie allein (12), oder einer Kombination dieser mit Ionenaustausch-Chromato-

graphie (22). Eine deutliche Steigerung des spezifischen Aktivität (550 µCi/µg) wurde mit der alleinigen Reinigung über Sp Sephadex C-25 Säule erzielt (40).
Andere Arbeiten, in welchen DATA-Sekretin zur Markierung verwendet wurde, erreichten eine hohe Einbaurate (80-85 %) (D.) und eine spezifische Aktivität von 350 µCi/µg (11, 16, 33). Sie verwendeten entweder eine "Cellulose-Powder-Colum" (11, 33) oder Sephadex G-15 (16). In diesen Arbeiten wurde der Reaktionsprozeß zwischen ^{125}J-Na, Sekretin, Chloramin T, mittels Natrium-Metabisulfit gestoppt, einem starken Antioxydans. Wir führen unsere hohe spezifische Aktivität von 739 µCi/µg, resultiernd aus der hohen Einbaurate von ca. 74 % auf den Einsatz geringer Mengen DATA-Sekretin, bezogen auf das ^{125}J-Na (mCi) zurück, sowie auf das Stoppen des Reaktionsprozesses mittels humanem Serum-Albumin, d. h. dem Angebot eines großen Reservoirs für den Austausch von "kalten" und überschüssigen radioaktiven Jod-Ionen. Ein weiterer Faktor ist in der Anwendung der Ionenaustausch-Chroatographie auf Sp Sephadex C-25 zu erkennen, welche eine Trennung auf der Basis der Massenladung herbeiführt. Letztere nimmt mit zunehmender Zerstörung des Peptid-Hormons ab.

Es wurde berichtet (30), daß eine Tracerzugabe pro Röhre ca. 3 pg Sekretin entsprechen soll, gleichzeitig aber eine spezifische Aktivität von nur 300 µCi/µg zugrundeliegt. Diese Aussage erscheint unverständlich, verglichen mit unseren Daten: wir gaben pro Röhre 5000 cpm, was ca. 4.7 pg Sekretin entspricht, wobei jedoch eine wesentlich höhere spezifische Aktivität zugrundeliegt. Jene Autoren müßten daher mit einer Tracerzugabe von ca. 1000 cpm pro Röhre gearbeitet haben, was mit der Leistung heutiger Zählgeräte praktisch nicht oder nur bedingt (sehr lange Zähldauer von Einzelproben) möglich ist.
Bloom et al. (Royal Postgraduate Medical School, London; persönliche Mitteilung) benutzten ein Tracer-Sekretin mit folgen-

den Merkmalen: Nonspecific binding 5 %, Excess antibody binding 93 %, zero binding 50 %, 2 x label dose per tube 46 % (Eigenhemmung), 1/2 label dose per tube 52 % (Anstieg der Bindung). Unser Tracer-Sekretin hat grob identische Merkmale (s. Seiten 41 und 43, was die Annahme stützt, daß er im RIA brauchbar ist.

4.1.3 Assay-Diluent und Inkubationsperiode

Der pH-Wert verschiedener Diluents bewegt sich zwischen 4 (22) und 8.6 (30). Als Medien wurden Phosphatpuffer 0.1 M, pH 7.4 (16); 0.04 M, pH 7.4, (14); 0.04 M, ph 6.5 (17); 0.02 M Barbitalpuffer, pH 8.6 (30); 0.05 M Kaliumphosphat, pH 5.0 (12); Tris-HCl, pH 7.8 (13), 0.1 M Na-acetat, pH 4.0 (22, unser Assay) verwendet. Die Zugabe von Albumin variierte stark, die Phosphat-Diluents enthalten von 3.4 g BSA/L (14) und 25 g BSA/L (17), die sauren Diluents von 1.8 g Albumin (12) bis ca. 10 g HSA/L (22, unser Assay), während im Tris-HCl-Diluent (13) lediglich 1 g BSA/L enthalten ist. Das Barbital-Diluent von Strauss und Yalow (30) dagegen enthält 2 % fötales Kälberserum. Offenbar ist die Natur bzw. Ionenstärke des Puffermediums eine sehr kritische Größe. Aus diesem Grund ist sie wahrscheinlich nicht einfach von Labor zu Labor zu reproduzieren.

Trasylol wird von 250 KIE/ml (16) über 500 KIE/ml (30) und 2500 KIE/ml (29, unser Assay), bis zu 2850 KIE/ml (14) zugegeben. Andere Autoren verwenden kein Trasylol (13, 17).
Ebenso unterschiedlich wird die Inkubationszeit gehandhabt: ein Autor (30) praktiziert seinen Äquilibrium-Assay über 7 Tage (Tracerzugabe sofort), andere praktizieren Dysäquilibrium-Assays mit versetzter Tracerzugabe, wie 24 h/24 h (17), 48 h/4 h (12), 48 h/18 h (22), 72 h/20 h (13), 72 h/24 h (unser Assay). Für diese disparaten Assay-Bedingungen gibt es keine einfache Erklärung. Vermutlich sind sowohl die Brauchbarkeit eines der obigen Diluents als auch die optimale Inkubationszeit abhängig vom verwendeten Antikörper. Erst in zweiter Linie sollten Unterschiede in der Zusammensetzung bzw. Reinheit gebräuchlicher Chemikalien bzw. Proteine diskutiert werden. Die Einhaltung einer bestimmten kons-

tanten Temperatur (Wasserbad von 4 ^{o} C; Raumtemperatur) erscheint hinter den vorgenannten Faktoren von nachgeordneter Bedeutung, obwohl unser Assay nur bei 4^{o} C Wasserbad-Temperatur optimale Ergebnisse liefert.

4.1.4 Vorbereitung der Proben

Eine Interferenz von Plasmabestandteilen mit dem Sekretin-RIA wird von allen Autoren berichtet, bzw. deren Ausschaltung als Notwendigkeit für zuverlässige RIA-Daten betrachtet (41). Im allgemeinen wird deshalb Plasma extrahiert und Sekretin im Extrakt gemessen.

Ein Autor (12) extrahierte Plasma mit Methanol, die Wiederfindung von zugegebenem synthetischem Sekretin im Plasma war 100 $\pm$ 8.3 %, die Wiederfindung von zugegebenem Tracer 52.4 % $\pm$ 3 %. Von der Extraktion mit Äthanol (14) wird eine Wiederfindung von Sekretin im Plasma zwischen 76 - 80 %, und von Tracer mit 75 % berichtet, was grob unseren Ergebnissen entspricht (s. Seite 58). Bei der Behandlung von Plasma mit XAD-2-Resin und nachfolgender Desorption mittels angesäuerten Methanols (15) wurden 55 - 75 % des zugegebenen Sekretins und 71 % des zugegebenen Tracers im Plasma gefunden. Ansäuerung des Plasmas auf pH 3.0 soll ebenfalls zur Umgehung der unspezifischen Interferenz von Plasma im Assay führen (Wiederfindung von natürlichem Sekretin 91.5 - 99.3 %; 22). Eine ähnliche Bearbeitung wie für Plasma erscheint auch für Gewebe erforderlich: nach Verdünnung der Proben mit hormonfreiem Plasma und Assay-Diluent ist die Wiederfindung von zugegebenem synthetischen Sekretin 86.3 % (16). Andere extrahierten Sekretin mittels angesäuertem (75 %) Äthanol (30).

Da die Effizienz der Extraktion mit Äthanol in unseren Händen zunächst größer war (95 %) als mit Methanol (60 %) oder Aceton (81 %), verfolgten wir die Äthanol-Extraktion weiter. Es gelang uns aber nicht, konstant eine befriedigende Wiederfindung von zugegebenem Stanard-Sekretin zu erreichen. Das meßbare Plasma-Sekretin erschien zu hoch.

Ebenfalls mit dem Ziel, unspezifisch bedingte Meßwerte zu umgehen, wurde die parallele Messung einer unbehandelten Plasmaprobe und der gleichen Probe nach vorheriger Entfernung des endogenen Hormons vorgeschlagen (17). Für diesen Zweck wurde Plasma mit 20 mg Norit-A-Kohle pro ml für 96 h bei 37 °C inkubiert. Die Differenz aus Plasmaprobe minus hormonfreier Probe ergibt sog. "wahres" Sekretin (=sog. Stripping-Verfahren). Die Wiederfindung von zugegebenem Sekretin liegt zwischen 80 - 138 %, die vom zugegebenem Tracer-Sekretin bei 89.2 %. Dieses Ergebnis stimmt gut überein mit unseren Daten, erreicht mittels der Methode der Differenzberechnung nach Vorbehandlung des Plasma mit Quso (mittlere Wiederfindung von synthetischem Standard-Sekretin 91.4 %).
Diese kritische Betrachtung erlaubt den Schluß,daß die von uns praktizierte Methode des Sekretin-RIA (Differenz- bzw. Stripping-Verfahren) den verschiedenen Extraktionsmodellen mindestens ebenbürtig, wahrscheinlich aber überlegen ist. Sie hat den zusätzlichen Vorteil einer guten Praktikabilität im Labor, d. h. simple Einwaage von Quso in die Zwillingsröhre, ohne die Notwendigkeit einer Inkubation. Der Nachteil eines größeren Bedarfs an Probenmaterial (ca. 0.9 ml Plasma pro Doppelbestimmung einer Unbekannten) erscheint zweitrangig.

4.1.5 Trennverfahren und Empfindlichkeit

Im allgemeinen werden für Sekretin-RIAs das Doppelantikörper-Verfahren (goat anti-rabbit γ-globulin serum; 16, bzw. donkey anti-rabbit serum; 22) oder das Kohle-Verfahren (aktive Holzkohle in Assaypuffer; 30) verwendet. Letzteres wird derzeit favorisiert, wobei des Trennmedium aus Assaypuffer, hormonfreiem Plasma und Aktivkohle (27, 13, 14 unser Verfahren) besteht. Die Zugabe von aktiver Kohle pro Ansatzröhre bewegt sich von 5 mg (30) über 18 mg (unser Assay, 13) bis 45 mg (27, 14). Beim Studium der Tracer-Kohle-Interaktion ist an drei zeitabhängige Phänomene zu

denken, soll der Prozentsatz des kohle-gebundenen Tracers über 1 - 2 h stabil bleiben: 1. Spontane De-Jodierung infolge Einwirkung proteolytischer Enzyme kann Tracer so schädigen, daß der Prozentsatz des intakten, kohle-gebundenen Tracers abnimmt (ist am wenigsten wahrscheinlich, wenn das Diluent ausreichend Trasylol enthält); 2. Kohle adsorbiert auch freien Antikörper, d. h. der Prozentsatz des freien Tracers (= nicht im Kohle-Pellet) kann zeitabhängig zunehmen,letzteres kann auch auf Grund abnehmender Bindungskapazität der Kohle für Tracer auftreten; 3. Kohle adsorbiert Tracer, der bereits an den Antikörper gebunden ist, die Folge ist Verringerung der Bindungskapazität für nicht an Antikörper gebundenen Tracer.
Die Identifikation des Optimalen Vorgehens bei der Zusammenstellung des Trennmediums ist mühsam, und beruht im wesentlichen auf dem "trial an error" - Prinzip (versuche es und ziehe aus den Irrtümern die richtigen Schlußfolgerungen). Auf diesbezügliche Originalarbeiten wird verwiesen (42).
Die minimale meßbare Menge (detection limit) an Sekretin mittels RIA wird unterschiedlich mitgeteilt. Sie reicht von 1 - 2 pg/ml (30), 3.2 pg/ml (14), 5.6 pg/ml (22), ca. 7 pg/ml (unser Assay), 8.7 pg/ml (12), 12,5 - 25 pg/ml (17) bis 50 pg/ml (16). Wichtigste Voraussetzungen für hohe Sensitivität sind neben der Reinheit der Assay-Substanzen (Antikörper, hohe spezifische Aktivität des Tracer, etc.) ein ideales Inkubationsschema und die objektive Trennung von antikörpergebundener und freier Phase des Tracers.

4.2.1 Basales Plasma-Sekretin bei verschiedenen Spezies im peripheren Blut

Die Durchschnittswerte für Sekretin im Nüchternblut des Menschen werden zwischen 3.2 - 21 pg/ml (12, 13, 14, 17, 22, 43, diese Arbeit) angegeben. Schaffalitzky und Fahrenkrug (14) berichten von 3.2, Bereich 6 - 18 pg/ml (n = 70) bzw. 4.5, Bereich 0 - 19 pg/ml (n = 17) (43). Burhol et al. (22) geben 11, Bereich 6 - 18 pg/ml (n = 15) an, Hannsen et al (12) 16 pg/ml (n = 5),

Byrnes et al. (17) 21, Bereich 0 - 80 pg/ml (n = 11). Tai und Chey (13) berichten von 0 - 21 pg/ml (n = 47). Wir fanden einen Durchschnittswert von 20, Bereich 0 - 158 pg/ml (n = 31) bzw. 10, Bereich 0 - 87 pg/ml (n = 29). unser Medianwert ist allerdings Null pg/ml, bei einer erheblichen Streuung der Einzelwerte, weshalb der Angabe des Medianwertes die größere Aussagekraft zukommt. Unsere relativ hohen Einzelwerte mögen darin begründet sein, daß einige Versuchspersonen trotz entsprechender Anweisungen nicht völlig nüchtern waren.

Beim Hund fanden Chang und Chey (41) Nüchternwerte von 12 pg/ml bei n = 9, Kim und Chey (44) berichten von 5.6 pg/ml bei n = 4. Wir finden wesentlich höhere Medianwerte 16 pg/ml (n = 16) (s. Seite 59) bzw. 12 pg/ml (n = 11) (s. Seite 60).

Bei dieser Spezies werden aber auch erheblich höhere Werte berichtet, Mittelwert 80 pg/ml (n = 7) (45), möglicherweise Ausdruck stark differenter Assay-Empfindlichkeit.

Im Gegensatz zum peripheren Blut finden wir nur eine Angabe zu Sekretin im Pfortaderblut (46). Diese Autoren finden beim Schwein 20 pg/ml (n = 7), ohne Angaben über die assoziierten peripheren Konzentrationen zu machen. Der Wert steht in guter Übereinstimmung mit 31 pg/ml (n = 15), welche wir bei der Ratte nachweisen können. In beiden Mitteilungen waren die Versuchstiere narkotisiert, was Schlußfolgerungen hinsichtlich der Existenz eines porto-systemischen Gradient von Sekretin zweifelhaft macht. Weitere Studien sind nötig, um diese Frage, insbesondere was die Rolle der Leberextraktion von Sekretin betrifft, beim wachen Tier zu beantworten.

Angaben zum basalen Plasma-Sekretin bei anderen Spezies als den oben genannten konnten wir der Literatur nicht entnehmen. Bei der barbiturat-narkotisierten Ratte finden wir in der Aorta 9 pg/ml, Median 0 (n = 15). Beim wachen Kaninchen 60, Bereich 0 - 510, Median 0 pg/ml (n = 17). Die hohen Werte von 6 Kaninchen könnten durch Koprophagie zu erklären sein, was unter normalen

Haltungsbedingungen nicht auszuschließen ist.
Unabhängig von der Spezies herrscht der Eindruck vor, daß basales Sekretin überwiegend unmeßbar niedrig ist, ausgenommen möglicherweise der Hund.

4.2.2 Antwort von Plasma-Sekretin auf intraduodenale Säure-Infusion

Ein Anstieg von Sekretin im Plasma während intraduodenaler Säure-Instillation wird von vielen Autoren beim Menschen (13, 15, 17, 20, 21, 47), beim Hund (13, 18, 19, 44) und Schwein (14, 46) berichtet. Demgegenüber wird erst in jüngster Zeit ein mahlzeitbedingter Anstieg beobachtet (15, 43, 48, 49,41, 50, 51, 52), was lange Zeit Zweifel auslöste, ob der wichtigste Stimulus für Sekretin intraduodenale Säure ist.
Byrnes et al. (17) geben beim Menschen einen Anstieg Nüchternwert 21 pg/ml auf 220 pg/ml nach einer intraduodenalen Säure-Instillation von 1 mM/min für 20 Minuten an. Gesamtdosis ca. 0.02 M HCl. Tai und Chey (13) berichten über Nüchternwerte in peripheren Plasma beim Menschen von 0 - 21 pg/ml, nach intraduodenaler Infusion von 4.4 ml/min 0,05 N HCl über 30 Minuten stieg Sekretin auf ca. 30 pg/ml an. Beim Hund verzeichnen die gleichen Autoren nach intraduodenaler Infusion von 2.2 ml/min 0.05 N HCl über 30 Minuten einen Anstieg auf ca. 55 pg/ml, ausgehend von ca. 4 pg/ml Nüchternwerten im Plasma.
Burhol et al. (22) fanden Nüchternwerte von ca. 11 pg/ml beim Menschen,nach zehnmintitiger duodenaler Infusion von 100 ml 0.1 M HCl wurden ca. 75 pg/ml beobachtet. Schaffalitzky und Fahrenkrug (14) fanden ebenfalls beim Menschen Werte von ca. 32 pg/ml, nach intraduodenaler Infusion von 40 ml 0.1 M HCl jedoch einen Anstieg auf ca. 90 pg/ml. Nach der gleichen Behandlung fanden diese Autoren im portalen Plasma des Schweins einen Anstieg auf 500 pg/ml. Hannsen et al. (12) fanden Nüchternwerte von ca. 16 pg/ml beim Menschen, welche nach intraduodenaler Instillation von 40 ml 0.1 M HCl während 15 Minuten

auf ca. 70 pg/ml anstiegen.
Wir hingegen fanden bei der barbiturat-narkotisierten Ratte nach 20-minütiger intraduodenaler Infusion von 0.1 M HCl (Infusionvolumen 1 ml) importalen Plasma einen signifikanten Anstieg, jedoch keinen im Plasma der abdominalen Aorta. Werden die Beobachtungen zusammengefaßt, so steht fest, daß immunoreaktives Plasma-Sekretin durch intraduodenale Säure freigesetzt wird. Dieser Effekt tritt bei den verschiedenen Säuger-Spezies und beim Menschen auf, ist also wahrscheinlich spzies-unabhängig. Dagegen ist noch unklar, ob bei einzelnen Spezies der porto-systemische Gradient infolge Narkose durch die Leber so modifiziert wird, daß der periphere Hormonanstieg nicht mehr nachweisbar ist (Ratte: eigene Versuche in dieser Arbeit) oder ob zusätzliche Unterschiede in der Versuchsanordnung verantwortlich sind (14).

4.2.3 Postprandiales Plasma-Sekretin

Gegenwärtig scheint festzustehen, daß a) peripheres Plasma-Sekretin binnen 1 Stunde nach Verabreichung einer Testmahlzeit deutlich angestiegen ist, b) dieser Anstieg durch Säurezufuhr aus dem Magen und daraus resultierender Erniedrigung des duodenalen pH vermittelt wird. Gleichzeitige Reduktion der Produktionskapazität für Magensäure, etwa durch intravenöse Infusion des Histamin-H_2-Rezetorenblockers Cimetidin, erlaubt diese elegante Beweisführung (44). Die jeweiligen experimentellen Umstände waren jedoch sehr variabel und verdienen Kommentare.
Beim Hund führen intragastrale Gabe von angesäuertem (pH 3) 10 %-igem Leberextrakt zur Freisetzung von Sekretin (53, 54, 55, 56), aber auch eine Testmahlzeit (15, 41, 44, 51, 52). Letzteres gilt auch für den Menschen (15, 43, 48, 49). Die Höhe des Sekretin-Anstiegs ist unterschiedlich. Chang und Chey (41) sahen beim Hund 30 pg/ml ca. 30 min postprandial, beim Menschen nach Einnahme einer Testmahlzeit (Rindfleisch, Brot, Kaffee, Orangensaft) zur gleichen Zeit jedoch nur 9 pg/ml (15)

Auch Schaffalitzky und Fahrenkrug (43) beobachten beim Menschen im peripheren Plasma (Nüchternwert ca. 4.5 pg/ml) einen mahlzeitbedingten (Beefsteak, Gemüse) Anstieg auf nur 14 pg/ml. In dieser Arbeit finden wir beim Hund (s. Seite 60 und Abb. 10 C) Werte, welche mit jenen von Chang und Chey (41) grob identisch sind. Dagegen ist beim Menschen (s. Seite 63, Tab 20) medianes postprandiales Sekretin ca. viermal höher als bei Schaffalitzky und Fahrenkrug (42), ca. siebenmal höher als bei Chey und Tai (15). Als Unterschied im Rahmen der Versuchsdurchführung muß erwähnt werden, daß unsere Versuchspersonen keine feste oder breiförmige , sondern eine flüssige Testmahlzeit (Vivasorb) schluckten, die kurzfristig zu trinken war. Zwar muß die durch Geschmack und Visus bedingte kephalische Phase der Magensekretion bei der Vorbereitung zu einer Standardmahlzeit (Steak!) bei unseren Probanden ungleich niedriger angesetzt werden, aber umgekehrt bedarf es keines Aufschlusses der vollbilanzierten flüssigen Nahrung. Bestandteile wie Aminosäure und Mineralien, dokumentierte Stimuli der Säure-Sekretion, kommen wahrscheinlich sofort zur Wirkung, und die Magenentleerung erfolgt bei flüssigem Inhalt rasch. Beide Komponenten erscheinen als realistische Erklärung für hohes postprandiales Plasma-Sekretin unter den von uns gewählten Bedingungen.

4.2.4 Kommentare zu Sekretin-Spezies

Über die Anwesenheit im portalen oder peripheren Plasma verschiedener molekularer Spezies von Sekretin finden wir in der Literatur keine Hinweise, wohl aber über solche in der Mucosa von Duodenum, Jejunum, Ileum (30). Letztere Autoren finden überwiegend, d. h. ca. 90 % monomeres Sekretin (MG$\geq$3 500), und nur geringe Anteile gel-chromatographisch an früherer Position erscheinendes Material (MG$\geq$3500). Unter dieser Annahme müßte bei den von den Autoren (30) studierten Versuchstierspezies (Affe, Ratte) auch im Plasma ausschließlich monomeres Sekretin auftreten, die

Anwendung geeigneter chromatographischer Techniken vorausgesetzt.
Unsere Beobachtung, daß unter Chromatographie mit 6 M Harnstoff im peripheren Plasma des Hundes, neben monomeren auch dimeres (sog. "Big"-) Material (MG ca. 7000) mit Sekretin-Immunoreaktivität auftritt, und außerdem ein weiterer höhermolekularer Präkursor (MG 10 000), ist im Einklang mit der Beobachtung von "Big-Sekretin" in der Darmmukosa des Hundes (57). Als Konsequenz ist die Annahme erlaubt, daß in unserer Serie zur engeren Charakterisierung von basalem Sekretin beim Hund (s. Seite 64), Sekretin-Präkursoren im Plasma Ausdruck von deren Synthese, Lagerung und Freisetzung durch die Ursprungszelle der Darmmukosa sind. Diese Annahme wird weiter gestützt durch die lange bekannte Tatsache, daß das strukturell dem Sekretin sehr nahestehende Glukagon ("sog. Glukagon-Familie") durch mehrere molekulare Spezies im Plasma von gesunden Menschen und Versuchstieren vertreten ist (58).

5. ZUSAMMENFASSUNG

1) Es wurde ein Sekretin-Radioimmunoassay mittels des sog. Stripping-Verfahrens (Vorbehandlung von Plasma Quso[1]) für die Messung von Sekretin im Plasma von Versuchstier und Mensch entwickelt. Die Nachweisgrenze ist ca. 7 pg/ml bei einer Endverdünnung von 1 : 630 000 und einer Assoziationskonstante von 2.1×10^{11} L/M.

2) Mit diesem System ist Plasma-Sekretin bei der untersuchten Spezies zuverlässig zu messen. Die Variationskoeffizienten sind (Prozent): Intraassay 12, Interassay 23. Die Medianwerte von basalem venösem Plasma-Sekretin sind (pg/ml) Hund 16, Kaninchen 0, Ratte (Aorta) 0, Ratte (Pfortader) 31, Mensch 0. Ein Sekretin Anstieg im Plasma der Aorta ist nach intraduodenaler Säureapplikation bei der Ratte nicht vorhanden, wohl aber steigt venöses peripheres Plasma-Sekretin postprandial sowohl bei Hund und Mensch signifikant an.

3) Gelchromatographische Untersuchungen mittels 6 M Harnstoff im 0.15 Natriumacetat pH 5, von Nüchternplasma des Hundes liefern Immunoreaktivität an drei Positionen, wobei die am weitesten rechts liegende mit monomerem Sekretin (Molekulargewicht ca. 3500) korrespondiert, die mittlere mit sog. "Big"- Sekretin (= Dimer von Sekretin, Molekulargewicht ca. 7000), jenes am weitesten links, d. h. in der Nähe des Säulenvolumens erscheinende Peak mit hochmolekularem Material, das Sekretin-Immunoreaktivität zeigt. Sinngemäß ist dieses als Präkursor bzw. Pro-Sekretin zu bezeichnen.

4) Aus den Untersuchungen wird gefolgert, daß a) infolge unspezifischer Interferenz von Plasmabestandteilen mit dem RIA-System für Sekretin nur eine vorherige Ausschaltung dieser Stör-

[1]) Silica Quarz

faktoren zu zuverlässigen Meßwerten führt, Mißachtung dieses Befundes jedoch falsch zu hohe Resultate liefert; b) Plasma-Sekretin ansteigt, wenn entweder Salzsäure im Duodenum vorhanden ist oder diese zusammen mit Nahrungsbestandteilen den Dünndarm erreicht; c) zumindest beim Hund verschiedene molekulare Formen von Sekretin im peripheren Plasma zirkulieren, deren biologische Bedeutung derzeit unbekannt ist.

Summary

1. A radioimmunoassay for measurment of secretin in the plasma of experimental animals and man has been developed by means of the so-called stripping procedure (pre-treatment of plasma with Quso[1]). The detection limit is about 7 pg/ml at a final dilution of 1 : 630 000 and an equilibrium constant of 2.1×10^{-11} L/M.

2. By means of this system plasma secretin in the species examined can be measured reliably. The coeffients of variation are (percent): the within assay precision (intra-assay) 12, the between assay precision (inter-assay) 23. The median of basal venous plasma secretin are (pg/ml) dog 16, rabbit 0, rat (aorta) 0, rat (porta) 31, man 0. There is no secretin rise in abdominal aortic plasma after intraduodenal acid administration in the rat, however plasma secretin in the venous periphery rises significantly postprandially both in dog and man.

3. Gelchromatographic investigations by means of 6 M urea in 0.15 M sodiumacetate pH 5 of basal (fasting) plasma of the dog reveals immunoreactivity at three positions. It can be demonstrated that the one on the utmost right side corresponds with monomeric secretin (molecular weight about 3 500); the middle peak corresponds with the so-called "big"-secretin (dimer of secretin, molecular weight about 7 000); the one on the utmost left side, i. e. the peak exhibiting high molecular weight material with secretin radioimmunoreactivity appearing near the column volume, cannot be identified more closely and may be named therefore, precursor respectively pro-secretin.

4. From these studies it is concluded that a) as a consequence of unspecific interference of plasma particles with the secretin RIA-system only a previous removal of these interfering factors leads to reliable test results; should this pre-requisite be neglected falsely too high results are to be expected;

[1] Silica Quarz

b) plasma secretin rises if there is either hydrochloric acid present in the duodenum or if gastric together with food particles reaches the duodenum; c) at least in the dog there may be different molecular species of secretin circulating in the peripherial plasma, however the bioloical role of these is unknown at present.

6. ANHANG

Einzelwerte zu:

Tab. 16: Reproduzierbarkeit der Bestimmung von Sekretin im gepoolten humanem Plasma.

11 Ansätze; je 1 Doppelprobe

Plasma	: 373	307	249	261	164	163	253	291	302	220	262
Plasma-Quso:	361	307	213	265	157	281	218	356	284	282	248
Differenz											
pg/ml	: 12	0	36	0	7	0	35	0	18	0	14

1 Ansatz; 9 Doppelproben

Plasma	: 262	249	202	293	219	216	287	269	239
Plasma-Quso:	248	285	293	255	273	248	296	268	196
Differenz									
pg/ml	: 14	0	0	38	0	0	0	1	33

Tab. 17: Basales Plasma-Sekretin beim Menschen mittels der Äthanol-Extraktion.

pg/ml: 31, 18, 30, 32, 28, 24, 22, 52, 37, 44, 33, 52, 31, 40

Tab. 18: Basales Plasma-Sekretin mittels der Methode der Differenzberechnung.

Mensch	pg/ml:	0, 0, 13, 0, 0, 0, 0, 43, 0, 11, 0, 10, 9, 0, 158, 0, 87, 17, 67, 47, 126, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 19
Hund	pg/ml:	36, 6, 9, 3, 1, 0, 7, 11, 29, 53, 0, 60, 30, 21, 37, 23,
Ratte-Aorta	pg/ml:	54, 0, 0, 0, 17, 1, 0, 0, 0, 22, 25, 25, 1, 0, 0,
Ratte-Pfortader	pg/ml:	16, 19, 36, 49, 98, 32, 39, 0, 34, 23, 21, 59, 31, 0, 15,
Kaninchen	pg/ml:	0, 0, 0, 235, 0, 510, 0, 130, 0, 100, 0, 0, 320, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 100, 0, 0,

Einzelwerte zu:

Tab. 19: Plasma-Sekretin (pg/ml) nach intraduodenaler HCl- oder NaCl-Infusion; in Pfortader und Aorta bei der Ratte.

HCl-Infusion

Aorta pg/ml: 0, 0, 0, 3, 0,
Pfortader pg/ml: 44, 41,183, 172,116,

NaCl-Infusion

Aorta pg/ml: 6, 0, 0, 0, 0,
Pfortader pg/ml: 56, 119, 0, 27, 79,

Abb. 10: Testmahlzeit beim Hund zum Studium des Verhaltens von postprandialem Plasma-Sekretin (pg/ml)

	Hunde mit okkludierten Pankreasgang					Hunde der Kontrollgruppe					
Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
-30[1)]	29	17	0	14	0	17	14	0	23	9	14
-10[1)]	26	7	0	5	7	23	8	12	37	7	0
+15[1)]	29	2	68	32	31	8	20	7	76	11	/
+30[1)]	69	36	49	6	19	5	4	0	17	12	17
+60[1)]	62	30	63	55	9	41	0	12	8	17	31
+120[1)]	26	15	51	39	12	52	0	11	16	4	0
+180[1)]	25	25	0	2	6	25	4	10	7	20	0

[1)] Blutentnahme (-) vor und (+) nach Eingabe der Testmahlzeit in Minuten

Tab. 20: Postprandiales Plasma-Sekretin beim Menschen

	1	2	3	4	5	6	7	8
A pg/ml:	85	0	30	0	73	102	0	0
B pg/ml:	92	67	76	0	91	83	0	44
C pg/ml:	0	40	0	113	73	104	0	7

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Mutt, V., Magnusson, S., Jorpes, J.E., Dahl, E.: Structure of porcine secretin I. Biochem. 4: 2358 - 2362, 1965

2. Bayliss, W., Starling, E. H.: Mechanism of pancreatic secretion. J. Physiol. 28: 325 - 353, 1902

3. Hubel, K. A.: Secretin: a long progress note. Gastroenerology 62: 318 - 341, 1972

4. Konturek, S. J., Dembinski, A., Thor, P., Krol, R.: Comparison of vasoactive intestinal peptide (VIP) and secretin in gastric and mucosal blood flow. Pflügers Arch. 361: 175 - 181, 1976

5. Sethi, R., Kukreja, S. C., Bouzer, E. N., Hargis, G. K., Williams, G. A.: Effect of secretin on parathyroid hormone and calcitonin secretion. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 53: 153 - 157, 1981

6. Levy, M.: Further observations on the response of the glomerular filtration rate to glucagon; comparison with secretin. Can. J. Physiol. Pharmakol. 53: 81 - 85, 1975

7. Beijer, H. J. M., Hulstaert, P.F., Browner, F.A.S., Charbon, G.A.: The effect of secretin on peripheral arterial blood flow. Arch. int. Pharmaeodyn. 240: 269 - 277, 1979

8. Schwille, P.O., Schellerer, W., Steiner, H., Reitzenstein, M.: Rat gastric mucosal oxygen tension, ulcer index, plasma, gastrin und glucagon following restraint stress. Influence of vagotomy, splanchnicotomy and exogenous secretin. Res. Exp. Med. 167: 149 - 158, 1976

9. Beglinger, C., Gyr, K., Werth, B., Keller, M., Girard, J.: Comparative effects of synthetic and natural seretin on pancreatic secretion and on secretin, insulin, and glucagon levels in man. Digestive Diseases and Sciences 27: 217 - 221, 1982

10. Vague, M., Stening, C.F., Brooks, F.P., Grossman, M.J.: Synthetic secretin: Comparsion with natural secretin for potency and spectrum of physiological actions. Gastroenterology 55: 260 - 267, 1968

11. Wünsch, E., Jeager, E., Moroder, L., Demling, L., Domschke, W., Reiss, M.: Radioimmunoassay für Sekretin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357: 1417 - 1420, 1976

12. Hannsen, L.E., Torjesen, P.: Radioimmunoassay of secretin in human plasma Scand. J. Gastroenerol. 12: 481 - 488, 1977

13. Tai, H.H., Chey, W.Y.: Rapid extraction of secretin from plasma by XAD-2 resin and its application in the radioimmunassay of secretin. Anal. Biochem. 87: 376 - 385, 1978

14. Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Fahrenkrug, J.: Radioimmunoassay of secretin in plasma. Scand. J. Clin. Invest. 37: 155 - 162, 1977

15. Chey, W. Y. Young, L.H., Hendricks, J.G., Rhodes, R.A., Tai, H.H.: Plasma secretin concentrations in fasting and postprandial state in man. Am. Digestive Diseases 23: 981 - 988, 1978

16. Koizumi, F., Ishimori, Koizumi, M.: Measurement of secretin in the mucosa of digestive tract by radioimmunoassay. Tokohaku J. exp. Med. 131: 339 - 346, 1980

17. Byrnes, D.J., Marjason, J.P.: Radioimmunoassay of secretin in plasma Horm. Metab. Res. 8: 361 - 365, 1976

18. Chey, W.Y., Kim, M.S., Lee, K.Y.: Influence of the vagus nerve on release and action of secretin in dog. J. Physiol. 293: 435 - 446, 1979

19. Isenberg, J.L., Cano, R., Bloom, S.R.: Effect of graded amounts of acid instilled into the duodenum on pancreatic bicarbonate secretion and plasma secretion in duodenual ulcer patients and normal subjects. Gastroenterology 72: 6 - 8, 1977

20. Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Fahrenkrug, J., Rune, S.J.: Physiological significance of secretin in the pancreatic bicarbonate secretion I. Responsiveness of secretin releasing system in the upper duodenum. Scand. J. Gastroenterol. 14: 79 - 83, 1979

21. Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Fahrenkrug, J., Matzen, D., Rune, S.J., Worning, H.: Physiological significance of secretin in the pancreatic bicarbonate secretion II. Pancreatic bicarbonate response to a phyiological increase on plasma secretin concentration. Scand. J. Gastroenterol. 14: 85 - 90, 1979

22. Burhol, P.G., Waldum, H.L.: Radioimmunoassay of secretin in acidified plasma. Acta Hepato-Gastroent. 25: 474 - 481, 1978

23. Geigy, J.R.: Wissenschaftliche Tabellen, Documenta Geigy, 6. Auflage, 1960

24. Greenwood, F.C., Hunter, W.M.,: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89: 114 - 123, 1963

25. Hunter, W.M., Greenwood, F.C.,: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89: 114 - 123, 1962

26. Sofroniew, M.V., Madler, M., Müller, O.A. Scriba, P.C.: A method for the consistent production of high quality antisera to small peptide hormones: Fresenius Z. Anal, Chem. 290: 163, 1978

27. Fahrenkrug, J., Schaffalitzky des Muckadell, O. B., Rehfeld, J.F.: Production and evaluation of antibodies for radioimmunoassay of secretin. Scand. J. Clin Lab. Invest. 36: 281 - 287, 1976

28. Tower, B.B., Sigel, M.B., Rubin, R.T., Poland, R. E., Vander-Laan, W.P.: Talc-resin-TCA-test-rapid screening of radiojodated polypeptide hormones for radioimmunoassay. Life Sci. 23: 2183 - 2192, 1978

29. Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 31: 660 - 672, 1949

30. Strauss, E., Yalow, R.S.: Immunoreactive in gastrointestinal mucosa of several mammalian species. Gastroenterology 75: 401 - 404, 1978

31. Morris, B.J.: Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement: A re-evaluation. Cli. Chim. Acta 73: 213 - 216, 1976

32. Gebhardt, C., Stolte, M.: Panreasgang - Okklusion durch Injektion einer schnell - härtenden Aminosäurenlösung. Langenbecks Arch. Chir. 346: 149, 1978

33. Urbach, H.J., Domschke, W., Reiss, M. Domschke, S., Rossalin, G., Wünsch, E., Jaeger, E., Moroder, L., Demling, L.: Superior immunoreactivity of ^{125}J-(Des-Tyr-ß-Ala-)secretin with rabbit anti-secretin sera compared to ^{125}J-secretin and ^{125}J-6-tyrosil-secretin. Hormon. Metab. Res. 8: 459 - 461 1976

34. Kewley, C.F: Depolarization- and ionophore- induced release of octacosa somatostatin from stalk median eminence synaptosomes. Science 213: 913 - 915, 1981

35. Schlegel, W., Raptis, S.: A reliable method for generating antibodies against pankreozymin, secretin and gastrin. Clin. Chimica, 73 : 439 - 444, 1976

36. Buchanan, K.D., Tale, J.D., Harper, G.: Antibodies to unconjugated synthetic and natural secretins. Horm. Metab. Res 4: 507, 1972

37. Hollohan, K.D., Murphy, R., Flanagan, R.W.J., Buchanan, K.D., Elmore. D.T.: Enzymic jodination of histidyl residue of secretin: A radioimmunoassay of the hormone. Biochimica et Biophysica Acta 322: 178 - 180, 1973

38. Young, J.D., Lazarus, L., Chisholm, D.J., Atkinson, F.F.V.: Radioimmunoassay of secretin in human serum. J. Nucl. Med. 9: 641 - 62, 1968

39. Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Fahrenkrug, J.: Preparation of ^{125}J-labelled synthetic porcine secretin for radioimmunoassay. Scand. J. clin. Lab. Invest. 36: 661 - 668, 1976

40. Tai, H.H., Korsch, B., Chey, W.: Preparation of ^{125}J-labelled secretin of high specific radioactivity. Analytical Biochemistry 69: 34 - 42, 1975

41. Chang, T.M., Chey. W. Y.: Radioimmunoassay of secretin - A critical review and current status. Digestive Diseases and Sciences 25: 529 - 552, 1980

42. Soelling, K.: A rapid and inexpensive radioimmunoassay for parathyroid hormone utilizing the wide principle in combination with improved operation techique. Clinica Chemica Acta 116: 349 - 359, 1981

43. Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Fahrenkrug, J.: Secretion pattern of secretin in man: Regulation by gastric acid. Gut 19: 812 - 818, 1978

44. Kim, M.S., Lee, K.Y.: Plasma secretin concentrations in fasting and postprandial states in dog. Am. J. Physiolo. 236: 539 - 544, 1979

45. Thompson, J.C., Llano, O.L., Schafmayer, A., Teichmann, R.K., Rayford, P.L.: Mechanismus of release and catabolism of secretin. Aus: Bloom, S.R.: Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York, 1978

46. Fahrenkrug, J., Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Holst, J.J.: Plasma secretin concentration in anesthetized pigs after intraduodenal glucose, fat, aminoacids or meals with various pH. Scand. J. Gastroent. 12: 273 - 279, 1977

47. Fahrenkrug, J., Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Rune, S.J.: pH threshold for release of secretin in normal subjects and in patients with duodenal ulcer and petients with chronic pancreatitis. Scand. J. Gastroent, 13: 177 - 186, 1978

48. Chey, W.Y., Hendricks, J., Tai, H.H.: Plasma secretin in fasting and postprandial state in amn. Gastroenterology 72: 1156, 1977

49. Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Fahrenkrug, J.: Role of secretin in man, III. Aus: Bloom, S.R., Gut Hormones, Churchill Livingstone, London and New York, 197 - 200, 1978

50. Straus, E., Yalow, R.S.: Hypersecretinemia associated with marked basal hydrochlorhydria in man and dog. Gastroenterology 72: 922 - 944, 1977

51. Schafmayer, A., Teichmann, R.K., Rayford, P.L., Thompson, J.C.: Physiologic release of secretin measured in peripherial and portal venous blood of dogs. Digestion 17: 509 - 515, 1978

52. Rayford, P.L., Curtis, P.J., Fender, H.R., Thompson, J.C.: Plasma levels of secretin in man and dogs: Validation of a secretin radioimmunoassay. Surgerey 79: 658 - 659, 1976

53. Konturek, S.J., Rayford, P.L., Thompson J.C.: Effect of pH of gastric and intestinal meals on gastric acid and plasma gastrin and secretin responses in the dog. Am. J. Physiol. 233: 537 - 543, 1977

54. Llanos, O.L., Konturek, S.J., Rayford, P.L., Thompson, J.C.: Secretin, gastrin and pancreatic bicarbonate response to meals varying pH levels. Aus Gastrointestinal Hormones and Pathology of the Digestive System, M. Grossmann, V. Speranza, N. Basso, E. Lezoche, (eds). New York, Plenum Press, 207 - 210, 1978

55. Konturek, S.J., Chey W.Y.: Relationship between plasma secretin and pancreatic bicarbonate secretion after postprandial duodenal acid loads or intravenous secretin. Aus: Chang, T.M., Chey, W.Y.: Radioimmunoassay of secretin - A critical review and current status. Digestive Diseases and Sciences, 25: 529 - 552, 1980

56. Chey, W.Y., Kim, M.S., Lee, K.Y., Chang, T.M.: Effect of rabbit anti-secretin serum on postprandial pancreatic secretion in dogs. Gastroenterology 77: 1268 - 1275, 1979

57. Boden, G., Murphy, N.S., Silver, E.: "Big"-Secretin (abstr.) Clin. Res. 23: 245, 1975

58. Jonathan, B., Jaspan, B., Rubenstein, A.H.: Circulation Glucagon, Plasma profiles and metabolism in health and disease. Diabetes 26, 90, 1977

Herrn Professor Dr. Dr. P. O. Schwille danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und seiner Unterstützung bei der Durchführung der mir gestellten Aufgabe.

Gleichzeitig möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie und des Hormonlabors danken.

Herrn Professor Dr. U. Lösch danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit über sein Institut einzureichen und für die wohlwollende Beratung bei der Durchsicht der Arbeit.

LEBENSLAUF

17. 02. 1953	Geboren in Schillingsfürst, Mittelfranken, als Sohn des Gerhard Wittmann und seiner Frau Erna Wittmann
1959 - 1964	Besuch der Volksschule Gattenhofen in Steinsfeld
1964 - 1973	Besuch des Reichstadt-Gymnasiums in Rothenburg o/T
1973 - 1974	Freiwilliges soziales Jahr mit Aktionsühnezeichen - Friedensdienste in London, England
1974 - 1979	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
30. 11. 1979	Staatsexamen
10. 01. 1980	Approbation als Tierarzt
05. 1980 - 06. 1982	In Zusammenarbeit mit der Abteilung Experimentelle Chirurgie der Chirurgischen Klinik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Anfertigung dieser Dissertation
15. 04. 1981	Heirat mit Frau Dipl. Psych. Thea Wittmann, geb. Leicht.